



**UNIVERSITEIT
GENT**

**FACULTEIT VAN DE FARMACEUTISCHE WETENSCHAPPEN
LABORATORIUM VOOR FARMACEUTISCHE BIOTECHNOLOGIE**

**ONDERZOEK VAN DE DNA-ADDUCTVORMING VAN EPOXIDEN EN
PLATINAVERBINDINGEN MET BEHULP VAN CAPILLAIRE ZONE
ELEKTROFORESE EN GEKOPPELDE ELEKTROSPRAY
MASSASPECTROMETRIE**

door

Apoth. Dieter Deforce

Proefschrift voorgelegd tot het verkrijgen van de graad van
Doctor in de Farmaceutische Wetenschappen

Promotor:
Prof. Dr. Apr. E.G. Van den Eeckhout

Copromotor:
Prof. Dr. E.L. Esmans

1998

VOORWOORD

Graag had ik iedereen die mij tijdens het totstandkomen van dit werk rechtstreeks of onrechtstreeks gesteund heeft van harte bedankt. Ik was verheugd dit werk te kunnen uitvoeren in het Laboratorium voor Farmaceutische Biotechnologie van de Universiteit Gent. In de eerste plaats wens ik dan ook Prof. Dr. Van den Eeckhout te bedanken voor de wetenschappelijke en persoonlijke begeleiding en steun tijdens het uitvoeren van dit onderzoek. Zonder haar inzet en stimulans zou dit werk niet tot stand zijn gekomen.

Dit project werd uitgevoerd in samenwerking met de Onderzoeksgroep Nucleosiden en Massaspectrometrie van de Universiteit Antwerpen. Ik ben dan ook bijzonder dank verschuldigd aan Prof. Dr. Esmans die mij gedurende mijn werkzaamheden wetenschappelijk stimuleerde en mij steeds bijstond met raad en daad.

Bovendien wens ik nog een aantal andere personen te danken voor hun bijdrage tot dit onderzoek: Prof. G. Kokotos van de Universiteit van Athene (Griekenland) voor het leveren van de cis-platina verbindingen, Dr. F. Lèmiere, Lic. I. Hoes en Ing. W. Van Dongen van de Universiteit Antwerpen voor de intensieve begeleiding bij het uitvoeren van de Massaspectrometrische opnames, Dr. F. Van Wijnendaele en Ing. J. Raymackers, beide van Innogenetics, die de metingen op het QTOF toestel mogelijk maakten en Prof. A. De Leenheer voor het gebruik van de Zeeman atomaire absorptiespectrofotometer. Mijn dank gaat ook uit naar Dhr. J. Santy die mij wegwijs maakte in de regels van de nieuwe spelling.

Mijn collega's van het laboratorium ben ik dankbaar voor de goede verstandhouding, de wetenschappelijke discussies en de steun, evenals alle professoren, personeelsleden en collega's van het F.F.W.

“Last but not least” wens ik mijn verloofde Ann te bedanken voor de steun, stimulans en de liefde die mij vooruit hielpen. Veel dank ben ik ook verschuldigd aan mijn ouders en familie voor “alles”. Ik ben hen dan ook extreem dankbaar.

Dieter Deforce, Gent december 1998.

INHOUD

Voorwoord.....	ii
Inhoud.....	iii
Lijst van gebruikte afkortingen	ix

Hoofdstuk I: Situering van het onderzoek en doelstellingen..... 1

I.1. Situering van het DNA-adductonderzoek	1
I.1.1. Het verband tussen DNA-adducten en het optreden van mutaties	3
I.1.2. Het verband tussen DNA-adducten en het ontstaan van kanker.....	5
I.1.3. Het verband tussen het optreden van mutaties en het ontstaan van kanker.....	7
I.1.4. Besluit.....	8
I.2. DNA-adductvorming van epoxiden	10
I.2.1. Inleiding.....	10
I.2.2. Fenylglycidylether (PGE)	11
I.2.2.1. Toxiciteit van PGE.....	12
I.2.2.2. Metabolisatie van PGE.....	13
I.2.2.3. Reglementering en blootstellingslimieten	14
I.3. Toepassingen in de chemotherapie.....	16
I.3.1. De ontdekking en de ontwikkeling van platinaverbindingen	16
I.4. Doelstellingen.....	18
I.5. Referenties.....	20

Hoofdstuk II: Ontwikkeling en optimalisatie van een capillaire zone elektroforetische scheidingsmethode voor de bepaling van 5'-monofosfaatnucleotide-adducten. 26

II.1. Literatuuroverzicht.....	26
II.1.1. Overzicht van de gebruikte analysemethodologieën op het vlak van DNA-adductonderzoek	26
II.1.1.1. De ³² P-postlabeling techniek.....	27
II.1.1.2. Immunologische technieken	27
II.1.1.3. GC-gebaseerde technieken.....	28
II.1.1.4. HPLC-gebaseerde technieken	28
II.1.2. Overzicht van de bestaande CZE-methodologieën	29
II.2. Inleiding	32
II.3. Materiaal en methoden.....	33
II.3.1. Chemicaliën.....	33
II.3.2. Adductbereiding	33
II.3.3. Capillaire zone elektroforesetoestel	34
II.3.4. Bufferbereiding.....	35
II.3.5. Capillaire zone elektroforese	36
II.3.6. Ontwikkeling van een “sample stacking”-systeem	37

II.3.7. Opzuivering op HR-P kolommen.....	38
II.4. Resultaten en bespreking	40
II.4.1. Keuze van het buffersysteem.....	40
II.4.2. Evaluatie van de invloed van de bufferconcentratie.....	40
II.4.2.1. Invloed op de migratietijd en de mobiliteit	41
II.4.2.2. Invloed op de efficiëntie	44
II.4.2.3. Invloed op de resolutie.....	47
II.4.2.4. Conclusies betreffende de invloed van de bufferconcentratie	48
II.4.3. Evaluatie van de invloed van de aangelegde spanning.....	49
II.4.3.1. Invloed op de migratietijd en de mobiliteit	49
II.4.3.2. Invloed op de efficiëntie	50
II.4.3.3. Invloed op de resolutie.....	51
II.4.3.4. Conclusies betreffende de invloed van de aangelegde spanning	52
II.4.4. Evaluatie van de invloed van de buffer pH	52
II.4.5. Injectie, detectielimieten en “sample stacking”-systeem.....	54
II.4.5.1. Detectielimieten	54
II.4.5.2. Optimalisatie van het “sample stacking”-systeem	55
II.4.6. Opzuivering op HR-P kolommen.....	59
II.4.7. Reproduceerbaarheid van de migratietijden	62
II.5. Besluit	65
II.6. Referenties	66

Hoofdstuk III: Ontwikkeling van een CZE on-line ES-MS- en ES-MS/MS-techniek voor de identificatie van 5'-monofosfaatnucleotideadducten. 70

III.1. Literatuuroverzicht.....	70
III.1.1. Overzicht van de bestaande ionisatiemethoden	70
III.1.2. Het elektroprayproces	71
III.1.3. CZE-ES-MS-koppelingstechnieken	73
III.1.3.1. Gebruik van een “sheath flow”	73
III.1.3.2. De “sheathless”-methode.....	75
III.1.3.3. De “liquid junction”-koppeling	76
III.1.4. Technieken om de stalen on line te concentreren in CZE-ES-MS.....	77
III.1.4.1. Technieken gebaseerd op capillaire isotachoforese (CITP).....	77
III.1.4.2. “Sample stacking”	78
III.1.5. Quadropool massaspectrometrie in vergelijking met TOF MS in combinatie met CZE-ES	79
III.2. Inleiding	81
III.3. Materiaal en methoden.....	82
III.3.1. Chemicaliën	82
III.3.2. Elektropray-quadropool massaspectrometer.....	82
III.3.3. CZE-ES-koppeling	83
III.3.4. On-line CZE-ES-MS “sample stacking”	85
III.3.5. Elektropray-QTOF massaspectrometer	87
III.4. Resultaten en bespreking	90

III.4.1. Optimalisatie van de spray en tuning van het ES-MS toestel	90
III.4.2. Optimalisatie van de “sheath”-vloeistofsamenstelling.....	91
III.4.3. Optimalisatie van de staalinjectie.....	93
III.4.4. Optimalisatie van de elektroforese	93
III.4.5. Gevoeligheid en lineariteit van de detectie	95
III.4.6. CZE-ES-QTOF	99
III.5. Besluit	101
III.6. Referenties	102

Hoofdstuk IV: Onderzoek van de interactie van PGE met 5'-monofosfaat-nucleotiden..... 104

IV.1. Literatuuroverzicht	104
IV.1.1. Adducten van 2'-deoxyadenosine met PGE.....	104
IV.1.2. Adducten van 2'-deoxyguanosine met PGE.....	105
IV.1.3. Adducten van 2'-deoxycytidine met PGE	105
IV.1.4. Adducten van thymidine met PGE	105
IV.2. Inleiding.....	106
IV.3. Materiaal en methoden	107
IV.3.1. Chemicaliën	107
IV.3.2. Adductbereiding	107
IV.3.3. Analyse van de reactiemengsels met CZE	108
IV.3.4. Analyse van de reactiemengsels met CZE-ES-MS.....	108
IV.3.5. Analyse van de reactiemengsels met CZE-ES-MS/MS	108
IV.4. Resultaten en bespreking.....	110
IV.4.1. Adducten van dAMP met PGE.....	110
IV.4.1.1. Mono-adduct van adenine met PGE, $t_m = 12.9$ min.	113
IV.4.1.2. Di-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 15.1$ min.	115
IV.4.1.3. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 16.1$ min.....	118
IV.4.1.4. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 18.1$ min.....	119
IV.4.1.5. Deoxyribose gemethoxyleerd op C-2' en gefosforyleerd op C-5', $t_m = 23.8$ min.....	120
IV.4.1.6. PGE-adduct van deoxyribose gemethoxyleerd op C-2' en gefosforyleerd op C-5', $t_m = 16.5$ min.....	121
IV.4.1.7. dAMP na incubatie in methanol.....	123
IV.4.2. Adducten van dGMP met PGE.....	125
IV.4.2.1. Di-adduct van guanine met PGE, $t_m = 12.9$ min.	129
IV.4.2.2. Di-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 15.7$ min.	129
IV.4.2.3. Di-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 17.2$ min.	130
IV.4.2.4. Mono-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 17.6$ min.....	131
IV.4.2.5. Mono-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 19.4$ min.....	132
IV.4.2.6. Imidazoolring-geopend dGMP-PGE adduct, $t_m = 19.5$ min.....	133
IV.4.3. Adducten van dCMP met PGE.....	135
IV.4.3.1. Di-adduct van dCMP met PGE, $t_m = 20.2$ min.	138
IV.4.3.2. Mono-adduct van dCMP met PGE, $t_m = 22.4$ min.....	139

IV.4.3.3. Mono-adduct van dCMP met PGE, $t_m = 25.6$ min.....	140
IV.4.3.4. Mono-adduct van dUMP met PGE, $t_m = 26.2$ min.....	141
IV.4.4. Adducten van TMP met PGE	143
IV.4.4.1. Di-adduct van TMP met PGE, $t_m = 15.8$ min.....	146
IV.4.4.2. Mono-adduct van TMP met PGE, $t_m = 17.0$ min.	147
IV.5. Besluit.....	149
IV.6. Referenties.....	150
Hoofdstuk V: Onderzoek van de interactie van PGE met DNA.....	152
V.1. Literatuuroverzicht	152
V.1.1. Belang van de studie van mogelijke fosfaatalkylering.....	152
V.1.2. Enzymatische hydrolyse van DNA tot 5'-mononucleotiden	153
V.2. Inleiding	154
V.3. Materiaal en methoden	155
V.3.1. Chemicaliën	155
V.3.2. Incubatie van DNA met PGE.....	155
V.3.3. Agarosegelelektroforese.....	156
V.3.4. Analyse van de reactiemengsels met CZE	157
V.3.5. Analyse van de reactiemengsels met CZE-ES-MS	157
V.3.6. Analyse van de reactiemengsels met CZE-ES-MS/MS	158
V.4. Resultaten en bespreking	159
V.4.1. Optimalisatie van de enzymatische hydrolyse	159
V.4.1.1. Nuclease P_1 hydrolyse.	159
V.4.1.2. SVP-hydrolyse.....	159
V.4.2. Invloed van de incubatieduur	161
V.4.2.1. Analyse op agarosegel	161
V.4.2.2. Analyse op CZE.....	162
V.4.3. Identificatie van DNA-PGE-adducten aanwezig in het supernatans	166
V.4.3.1. Mono-adduct van dCMP met PGE, $t_m = 17.7$ min.	169
V.4.3.2. Di-gealkyleerd fosfaat, $t_m = 17.9$ min.....	170
V.4.3.3. Mono-gealkyleerd di-methoxy-difosfaat, $t_m = 18.5$ min.	171
V.4.3.4. Mono-gealkyleerd methoxy-difosfaat, $t_m = 25.0$ min en 25.9 min.....	174
V.4.3.5. Mono-gealkyleerd methoxy-fosfaat, $t_m = 19.5$ min	175
V.4.3.6. Mono-gealkyleerd fosfaat, $t_m = 21.5$ min en 25.4 min	176
V.4.3.7. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 19.8$ min.....	178
V.4.4. Adducten aanwezig in het DNA-hydrolysaat.....	180
V.4.4.1. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 5.25$ min.	184
V.4.4.2. Mono-adduct van TMP met PGE, $t_m = 6.21$ min.	185
V.4.4.3. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 7.20$ min en 7.75 min.....	186
V.4.4.4. Mono-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 7.50$ min en 8.65 min.....	187
V.4.4.5. Mono-adduct van TMP met PGE, $t_m = 8.25$ min.	190
V.4.4.6. Mono-adduct van dUMP met PGE, $t_m = 8.55$ min.....	191
V.4.4.7. Mono-adduct van dAMP-TMP met PGE, $t_m = 9.45$ min.	192

V.4.4.8. Mono-adduct van dCMP-TMP met PGE, $t_m = 9.84$ min.....	195
V.4.4.9. Mono-adduct van TMP-TMP met PGE, $t_m = 10.23$ min.....	196
V.4.5. Verder onderzoek van de gealkyleerde dinucleotiden	198
V.5. Besluit.....	201
V.6. Referenties	203

Hoofdstuk VI: Onderzoek van de interactie van platinaverbindingen met DNA. 205

VI.1. Literatuuroverzicht	205
VI.1.1. Adductvorming van cisplatina en platinaverbindingen	205
VI.1.2. Preparatieve CZE	207
VI.2. Inleiding.....	210
VI.3. Materiaal en methoden	211
VI.3.1. Chemicaliën	211
VI.3.2. Bepaling van de cytotoxiciteit van de platinaverbindingen	212
VI.3.3. Reactie van de platinaverbindingen met DNA	214
VI.3.4. Gelfiltratie.....	215
VI.3.5. Deplatineren met thiourem	216
VI.3.6. Analyse met CZE	216
VI.3.7. Preparatieve CZE	217
VI.3.8. ZAAS	218
VI.3.9. Bepaling van de reactieproducten van de platinaverbindingen met oligonucleotiden met behulp van CZE-ES-QTOF.....	219
VI.3.9.1. CZE-ES-QTOF.....	220
VI.4. Resultaten en bespreking.....	224
VI.4.1. Cytotoxiciteit van de platinaverbindingen	224
VI.4.1.1. Cytotoxiciteit van cis-dichloor-di(6-aminocoumarine)-platina (II) CDAP225	
VI.4.1.2. Cytotoxiciteit van cis-dichloor-di(3-acetamido-6-aminocoumarine)-platina (II) CDAAP.....	226
VI.4.1.3. Cytotoxiciteit van cis-dichloor-di(7-amino-4-methylcoumarine)-platina (II) CDAMP.....	227
VI.4.1.4. Cytotoxiciteit van cis-dichloor-di(7-amino-4-trifluormethylcoumarine)-platina (II) CDATP	228
VI.4.1.5. Cytotoxiciteit van cis-dichloor-di(7-amino-4-methyl-quinolin-2-one)-platina (II) CDAQP	229
VI.4.2. Onderzoek naar de interactie van de platinaverbindingen met DNA	231
VI.4.2.1. Analyse met CZE	231
VI.4.2.2. Bepaling van de efficiëntie van de DNA-CDAP complexvorming.....	233
VI.4.2.3. Preparatieve CZE gecombineerd met ZAAS	234
VI.4.2.4. Analyse met ZAAS na gelfiltratie	236
VI.4.2.5. CZE-analyse na deplatineren met thiourem	238
VI.4.2.6. Analyse met CZE-ES-QTOF.....	240
VI.5. Besluit.....	245
VI.6. Referenties.....	246

Samenvatting en besluit.....	249
Summary and conclusion	254

INHOUD

Voorwoord.....	ii
Inhoud.....	iii
Lijst van gebruikte afkortingen	ix

Hoofdstuk I: Situering van het onderzoek en doelstellingen..... 1

I.1. Situering van het DNA-adductonderzoek	1
I.1.1. Het verband tussen DNA-adducten en het optreden van mutaties	3
I.1.2. Het verband tussen DNA-adducten en het ontstaan van kanker.....	5
I.1.3. Het verband tussen het optreden van mutaties en het ontstaan van kanker.....	7
I.1.4. Besluit.....	8
I.2. DNA-adductvorming van epoxiden	10
I.2.1. Inleiding.....	10
I.2.2. Fenylglycidylether (PGE)	11
I.2.2.1. Toxiciteit van PGE.....	12
I.2.2.2. Metabolisatie van PGE.....	13
I.2.2.3. Reglementering en blootstellingslimieten	14
I.3. Toepassingen in de chemotherapie.....	16
I.3.1. De ontdekking en de ontwikkeling van platinaverbindingen	16
I.4. Doelstellingen.....	18
I.5. Referenties.....	20

Hoofdstuk II: Ontwikkeling en optimalisatie van een capillaire zone elektroforetische scheidingsmethode voor de bepaling van 5'-monofosfaatnucleotide-adducten. 26

II.1. Literatuuroverzicht.....	26
II.1.1. Overzicht van de gebruikte analysemethodologieën op het vlak van DNA-adductonderzoek	26
II.1.1.1. De ³² P-postlabeling techniek.....	27
II.1.1.2. Immunologische technieken	27
II.1.1.3. GC-gebaseerde technieken.....	28
II.1.1.4. HPLC-gebaseerde technieken	28
II.1.2. Overzicht van de bestaande CZE-methodologieën	29
II.2. Inleiding	32
II.3. Materiaal en methoden.....	33
II.3.1. Chemicaliën.....	33
II.3.2. Adductbereiding	33
II.3.3. Capillaire zone elektroforesetoestel	34
II.3.4. Bufferbereiding.....	35
II.3.5. Capillaire zone elektroforese	36
II.3.6. Ontwikkeling van een “sample stacking”-systeem	37

II.3.7. Opzuivering op HR-P kolommen.....	38
II.4. Resultaten en bespreking	40
II.4.1. Keuze van het buffersysteem.....	40
II.4.2. Evaluatie van de invloed van de bufferconcentratie.....	40
II.4.2.1. Invloed op de migratietijd en de mobiliteit	41
II.4.2.2. Invloed op de efficiëntie	44
II.4.2.3. Invloed op de resolutie.....	47
II.4.2.4. Conclusies betreffende de invloed van de bufferconcentratie	48
II.4.3. Evaluatie van de invloed van de aangelegde spanning.....	49
II.4.3.1. Invloed op de migratietijd en de mobiliteit	49
II.4.3.2. Invloed op de efficiëntie	50
II.4.3.3. Invloed op de resolutie.....	51
II.4.3.4. Conclusies betreffende de invloed van de aangelegde spanning	52
II.4.4. Evaluatie van de invloed van de buffer pH	52
II.4.5. Injectie, detectielimieten en “sample stacking”-systeem.....	54
II.4.5.1. Detectielimieten	54
II.4.5.2. Optimalisatie van het “sample stacking”-systeem	55
II.4.6. Opzuivering op HR-P kolommen.....	59
II.4.7. Reproduceerbaarheid van de migratietijden	62
II.5. Besluit	65
II.6. Referenties	66

Hoofdstuk III: Ontwikkeling van een CZE on-line ES-MS- en ES-MS/MS-techniek voor de identificatie van 5'-monofosfaatnucleotideadducten. 70

III.1. Literatuuroverzicht.....	70
III.1.1. Overzicht van de bestaande ionisatiemethoden	70
III.1.2. Het elektroprayproces	71
III.1.3. CZE-ES-MS-koppelingstechnieken	73
III.1.3.1. Gebruik van een “sheath flow”	73
III.1.3.2. De “sheathless”-methode.....	75
III.1.3.3. De “liquid junction”-koppeling	76
III.1.4. Technieken om de stalen on line te concentreren in CZE-ES-MS.....	77
III.1.4.1. Technieken gebaseerd op capillaire isotachoforese (CITP).....	77
III.1.4.2. “Sample stacking”	78
III.1.5. Quadropool massaspectrometrie in vergelijking met TOF MS in combinatie met CZE-ES	79
III.2. Inleiding	81
III.3. Materiaal en methoden.....	82
III.3.1. Chemicaliën	82
III.3.2. Elektropray-quadropool massaspectrometer.....	82
III.3.3. CZE-ES-koppeling	83
III.3.4. On-line CZE-ES-MS “sample stacking”	85
III.3.5. Elektropray-QTOF massaspectrometer	87
III.4. Resultaten en bespreking	90

III.4.1. Optimalisatie van de spray en tuning van het ES-MS toestel	90
III.4.2. Optimalisatie van de “sheath”-vloeistofsamenstelling.....	91
III.4.3. Optimalisatie van de staalinjectie.....	93
III.4.4. Optimalisatie van de elektroforese	93
III.4.5. Gevoeligheid en lineariteit van de detectie	95
III.4.6. CZE-ES-QTOF	99
III.5. Besluit	101
III.6. Referenties	102

Hoofdstuk IV: Onderzoek van de interactie van PGE met 5'-monofosfaat-nucleotiden..... 104

IV.1. Literatuuroverzicht	104
IV.1.1. Adducten van 2'-deoxyadenosine met PGE.....	104
IV.1.2. Adducten van 2'-deoxyguanosine met PGE.....	105
IV.1.3. Adducten van 2'-deoxycytidine met PGE	105
IV.1.4. Adducten van thymidine met PGE	105
IV.2. Inleiding.....	106
IV.3. Materiaal en methoden	107
IV.3.1. Chemicaliën	107
IV.3.2. Adductbereiding	107
IV.3.3. Analyse van de reactiemengsels met CZE	108
IV.3.4. Analyse van de reactiemengsels met CZE-ES-MS.....	108
IV.3.5. Analyse van de reactiemengsels met CZE-ES-MS/MS	108
IV.4. Resultaten en bespreking.....	110
IV.4.1. Adducten van dAMP met PGE.....	110
IV.4.1.1. Mono-adduct van adenine met PGE, $t_m = 12.9$ min.	113
IV.4.1.2. Di-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 15.1$ min.	115
IV.4.1.3. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 16.1$ min.....	118
IV.4.1.4. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 18.1$ min.....	119
IV.4.1.5. Deoxyribose gemethoxyleerd op C-2' en gefosforyleerd op C-5', $t_m = 23.8$ min.....	120
IV.4.1.6. PGE-adduct van deoxyribose gemethoxyleerd op C-2' en gefosforyleerd op C-5', $t_m = 16.5$ min.....	121
IV.4.1.7. dAMP na incubatie in methanol.....	123
IV.4.2. Adducten van dGMP met PGE.....	125
IV.4.2.1. Di-adduct van guanine met PGE, $t_m = 12.9$ min.	129
IV.4.2.2. Di-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 15.7$ min.	129
IV.4.2.3. Di-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 17.2$ min.	130
IV.4.2.4. Mono-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 17.6$ min.....	131
IV.4.2.5. Mono-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 19.4$ min.....	132
IV.4.2.6. Imidazoolring-geopend dGMP-PGE adduct, $t_m = 19.5$ min.....	133
IV.4.3. Adducten van dCMP met PGE.....	135
IV.4.3.1. Di-adduct van dCMP met PGE, $t_m = 20.2$ min.	138
IV.4.3.2. Mono-adduct van dCMP met PGE, $t_m = 22.4$ min.....	139

IV.4.3.3. Mono-adduct van dCMP met PGE, $t_m = 25.6$ min.....	140
IV.4.3.4. Mono-adduct van dUMP met PGE, $t_m = 26.2$ min.....	141
IV.4.4. Adducten van TMP met PGE	143
IV.4.4.1. Di-adduct van TMP met PGE, $t_m = 15.8$ min.....	146
IV.4.4.2. Mono-adduct van TMP met PGE, $t_m = 17.0$ min.	147
IV.5. Besluit.....	149
IV.6. Referenties.....	150
Hoofdstuk V: Onderzoek van de interactie van PGE met DNA.....	152
V.1. Literatuuroverzicht	152
V.1.1. Belang van de studie van mogelijke fosfaatalkylering.....	152
V.1.2. Enzymatische hydrolyse van DNA tot 5'-mononucleotiden	153
V.2. Inleiding	154
V.3. Materiaal en methoden	155
V.3.1. Chemicaliën	155
V.3.2. Incubatie van DNA met PGE.....	155
V.3.3. Agarosegelelektroforese.....	156
V.3.4. Analyse van de reactiemengsels met CZE	157
V.3.5. Analyse van de reactiemengsels met CZE-ES-MS	157
V.3.6. Analyse van de reactiemengsels met CZE-ES-MS/MS	158
V.4. Resultaten en bespreking	159
V.4.1. Optimalisatie van de enzymatische hydrolyse	159
V.4.1.1. Nuclease P_1 hydrolyse.	159
V.4.1.2. SVP-hydrolyse.....	159
V.4.2. Invloed van de incubatieduur	161
V.4.2.1. Analyse op agarosegel	161
V.4.2.2. Analyse op CZE.....	162
V.4.3. Identificatie van DNA-PGE-adducten aanwezig in het supernatans	166
V.4.3.1. Mono-adduct van dCMP met PGE, $t_m = 17.7$ min.	169
V.4.3.2. Di-gealkyleerd fosfaat, $t_m = 17.9$ min.....	170
V.4.3.3. Mono-gealkyleerd di-methoxy-difosfaat, $t_m = 18.5$ min.	171
V.4.3.4. Mono-gealkyleerd methoxy-difosfaat, $t_m = 25.0$ min en 25.9 min.....	174
V.4.3.5. Mono-gealkyleerd methoxy-fosfaat, $t_m = 19.5$ min	175
V.4.3.6. Mono-gealkyleerd fosfaat, $t_m = 21.5$ min en 25.4 min	176
V.4.3.7. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 19.8$ min.....	178
V.4.4. Adducten aanwezig in het DNA-hydrolysaat.....	180
V.4.4.1. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 5.25$ min.	184
V.4.4.2. Mono-adduct van TMP met PGE, $t_m = 6.21$ min.	185
V.4.4.3. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 7.20$ min en 7.75 min.....	186
V.4.4.4. Mono-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 7.50$ min en 8.65 min.....	187
V.4.4.5. Mono-adduct van TMP met PGE, $t_m = 8.25$ min.	190
V.4.4.6. Mono-adduct van dUMP met PGE, $t_m = 8.55$ min.....	191
V.4.4.7. Mono-adduct van dAMP-TMP met PGE, $t_m = 9.45$ min.	192

V.4.4.8. Mono-adduct van dCMP-TMP met PGE, $t_m = 9.84$ min.....	195
V.4.4.9. Mono-adduct van TMP-TMP met PGE, $t_m = 10.23$ min.....	196
V.4.5. Verder onderzoek van de gealkyleerde dinucleotiden	198
V.5. Besluit.....	201
V.6. Referenties	203

Hoofdstuk VI: Onderzoek van de interactie van platinaverbindingen met DNA. 205

VI.1. Literatuuroverzicht	205
VI.1.1. Adductvorming van cisplatina en platinaverbindingen	205
VI.1.2. Preparatieve CZE	207
VI.2. Inleiding.....	210
VI.3. Materiaal en methoden	211
VI.3.1. Chemicaliën	211
VI.3.2. Bepaling van de cytotoxiciteit van de platinaverbindingen	212
VI.3.3. Reactie van de platinaverbindingen met DNA	214
VI.3.4. Gelfiltratie.....	215
VI.3.5. Deplatineren met thioureum	216
VI.3.6. Analyse met CZE	216
VI.3.7. Preparatieve CZE	217
VI.3.8. ZAAS	218
VI.3.9. Bepaling van de reactieproducten van de platinaverbindingen met oligonucleotiden met behulp van CZE-ES-QTOF.....	219
VI.3.9.1. CZE-ES-QTOF.....	220
VI.4. Resultaten en bespreking.....	224
VI.4.1. Cytotoxiciteit van de platinaverbindingen	224
VI.4.1.1. Cytotoxiciteit van cis-dichloor-di(6-aminocoumarine)-platina (II) CDAP225	
VI.4.1.2. Cytotoxiciteit van cis-dichloor-di(3-acetamido-6-aminocoumarine)-platina (II) CDAAP.....	226
VI.4.1.3. Cytotoxiciteit van cis-dichloor-di(7-amino-4-methylcoumarine)-platina (II) CDAMP.....	227
VI.4.1.4. Cytotoxiciteit van cis-dichloor-di(7-amino-4-trifluormethylcoumarine)-platina (II) CDATP	228
VI.4.1.5. Cytotoxiciteit van cis-dichloor-di(7-amino-4-methyl-quinolin-2-one)-platina (II) CDAQP	229
VI.4.2. Onderzoek naar de interactie van de platinaverbindingen met DNA	231
VI.4.2.1. Analyse met CZE	231
VI.4.2.2. Bepaling van de efficiëntie van de DNA-CDAP complexvorming.....	233
VI.4.2.3. Preparatieve CZE gecombineerd met ZAAS	234
VI.4.2.4. Analyse met ZAAS na gelfiltratie	236
VI.4.2.5. CZE-analyse na deplatineren met thioureum	238
VI.4.2.6. Analyse met CZE-ES-QTOF.....	240
VI.5. Besluit.....	245
VI.6. Referenties.....	246

Samenvatting en besluit.....	249
Summary and conclusion	254

Hoofdstuk I: Situering van het onderzoek en doelstellingen.

De hoofdbetrachting van dit werk was het ontwikkelen van een analytische methodologie die zowel de detectie als de identificatie van DNA-adducten toeliet. Gezien de onderzoeksgroep waarvan ik deel uitmaakte reeds een grondige ervaring had verworven in het onderzoek naar de interactie tussen nucleosiden en (+/-)-2,3-epoxypropyl-fenyl-ether, waarnaar verder gerefereerd zal worden als fenylglycidylether (PGE), werd deze component geselecteerd als adductvormer om de analytische methode op punt te stellen en te evalueren.

Tevens werd deze component gebruikt als modelstof om de adductvorming van alifatische epoxiden met DNA te evalueren met de op punt gestelde analytische methodologie.

Met behulp van deze analysemethode werd eveneens onderzoek verricht naar een nieuwe groep platinaverbindingen die ons door Professor Kokotos ter beschikking werden gesteld. Deze platinaverbindingen werden door de groep van Professor Kokotos gesynthetiseerd (Kokotos et al., 1997) in de zoektocht naar nieuwe potentiële antikanker chemotherapeutica.

I.1. Situering van het DNA-adductonderzoek

Overal ter wereld worden dagelijks mensen blootgesteld aan chemische carcinogenen die aanwezig kunnen zijn in het milieu, in ons voedsel, in onze werkomgeving of die ons om medische doeleinden kunnen worden toegediend, denken we maar aan de welbekende chemotherapie.

Teneinde het aantal kankergevallen in te perken moeten dus technieken ontwikkeld worden om deze carcinogenen te identificeren en ze te classificeren naargelang hun relatieve carcinogeniteit. Evenzeer dienen nieuwe chemische componenten aan een dergelijk onderzoek onderworpen te worden. De enige methode om met zekerheid te bepalen of een component al dan niet een menselijk carcinogeen is, is het uitvoeren van epidemiologische studies, en een vijftigtal componenten waren in 1989 reeds op die manier geïdentificeerd (Tomatis et al., 1989). Deze epidemiologische studies waren vooral succesvol in die gevallen waar bij ongeval een grote groep mensen blootgesteld werden aan een relatief hoge concentratie van een welbepaalde component. Aangezien het echter voor vele componenten onmogelijk is dergelijke epidemiologische studies uit te voeren werd het concept “biomonitoring” ingevoerd. Biomonitoring bestaat erin dat de interne dosis van een toxische component bepaald wordt door het kwalitatief bepalen van de chemische interactie van de component met biologische macromoleculen, zoals proteïnen en DNA. Dergelijke metingen vallen in vele opzichten te verkiezen boven het bepalen van externe dosissen omdat dergelijke bepalingen individuele verschillen in absorptie, metabolisme, distributie en excretie weerspiegelen en dus een accuratere risico-evaluatie toelaten (Farmer, 1994).

Deze techniek is vooral bruikbaar om blootstelling aan genotoxische componenten op te sporen. De stoffen die kanker veroorzaken kunnen in twee groepen onderverdeeld worden naargelang ze al dan niet genotoxisch zijn, alhoewel het onderscheid niet altijd even duidelijk is (Pitot en Dragan, 1991). Het werkingsmechanisme van niet-genotoxische stoffen is divers en niet volledig achterhaald, maar aangenomen wordt dat de kankerinitiatie bij deze stoffen niet gebeurt door directe interactie met DNA, maar eerder door interactie met het controle mechanisme voor de cellulaire proliferatie.

Daartegenover staan de genotoxische stoffen, die minstens de helft uitmaken van de bekende chemische carcinogenen, waarvan het werkingsmechanisme beter gekend is (Tomatis et al., 1989). Deze componenten hebben de gemeenschappelijke eigenschap dat ze kunnen reageren met DNA en aanleiding geven tot covalent gebonden producten, die aangeduid worden als DNA-adducten.

Sommige genotoxische carcinogenen kunnen direct ageren op het DNA, het zijn dus intrinsiek chemisch reactieve componenten die covalent kunnen binden met het DNA. In veel gevallen is echter een metabolische activering van het genotoxische carcinogeen nodig vooraleer reactie met DNA kan optreden. Chemisch gezien bezitten deze genotoxische stoffen een elektron-deficiënt centrum dat in reactie treedt met de nucleofiele plaatsen op de DNA-molecule. Deze nucleofiele plaatsen zijn de zuurstof- en stikstofatomen van de purine- en pyrimidinebasen en de zuurstoffen aanwezig op de fosfaatgroepen (Hemminki, 1983; Richardson et al., 1987). De genotoxische producten vertonen onderling veel verschillen niet alleen in hun spectrum van gevormde adducten (kwalitatief) maar ook in de relatieve hoeveelheid van elk gevormd adduct (Richardson et al., 1987).

Deze carcinogenen kunnen bovendien ook adducten vormen met de proteïnen aanwezig in de cel. Alhoewel dit als minder relevant wordt beschouwd in het carcinogeen proces, worden deze proteïneadducten, grotendeels uit praktisch experimenteel standpunt, veelvuldig gebruikt in de biomonitoring (Farmer, 1994). Het meest gebruikte proteïne voor dit doeleinde is het hemoglobine dat gezien zijn grote beschikbaarheid en lange halfwaardetijd in het bloed bijzonder geschikt is voor het nagaan van eventuele blootstelling aan carcinogenen (Skipper en Tannenbaum, 1990).

De hoeveelheid DNA- (of proteïne-) adducten die gevormd wordt bij blootstelling aan genotoxische stoffen is over het algemeen heel laag. Zelfs in dieren die behandeld worden met carcinogene dosissen kan het aantal gevormde DNA-adducten zich beperken tot één adduct op 10^5 ongemodificeerde basen (Farmer, 1994). In mensen die blootgesteld werden aan carcinogene stoffen uit hun omgeving kan de hoeveelheid adducten zich beperken tot één adduct op 10^7 tot 10^8 ongemodificeerde basen (Perera et al., 1992). Met als gevolg dat de analytische strategieën bruikbaar voor biomonitoring extreem gevoelig dienen te zijn.

Het was één van de doelstellingen van dit werk om een analyse methode te ontwikkelen die voldoende gevoelig was om dergelijk onderzoek toe te laten en bovendien structurele identificatie van de gevormde adducten toeliet. Wij vonden beide eigenschappen verenigd in de *on line* koppeling van capillaire zone

elektroforese aan elektropray massaspectrometrie (CZE-ES-MS).

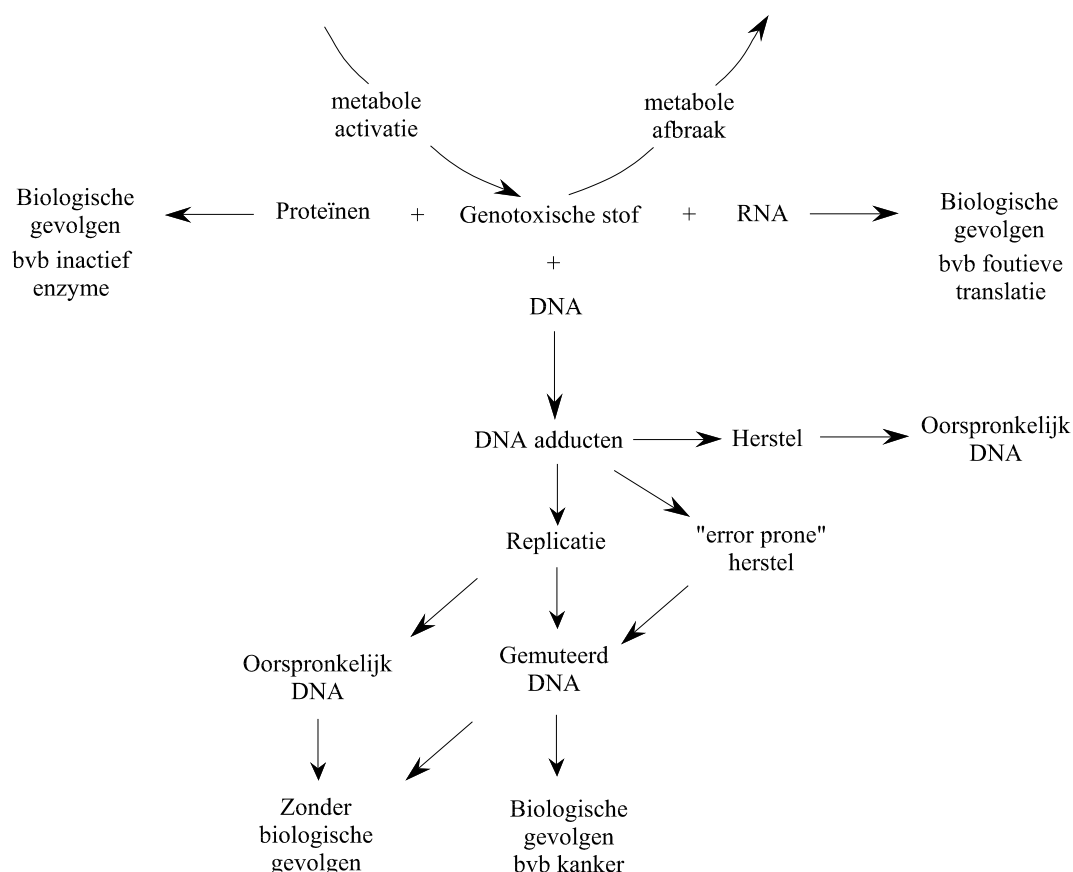
1.1.1. Het verband tussen DNA-adducten en het optreden van mutaties

Vele genotoxische stoffen vormen covalente adducten die echter spontaan (door bvb depurinatie) of door biologische processen weer uit het DNA verdwijnen (Hemminki, 1983). Een groot aantal enzymatische herstellingsmechanismen bestaan die de adducten opnieuw uit het DNA kunnen verwijderen en zo de oorspronkelijke DNA-structuur herstellen (Karran en Lindahl, 1985). De herstelling kan gebeuren door de binding tussen de alkylatie en de DNA-base te verbreken of door het verwijderen van de gemodificeerde base met daaropvolgend herstel. Verondersteld wordt dat mutaties kunnen ontstaan gedurende DNA-replicatie van de beschadigde plaats of ten gevolge van “error prone” DNA-herstel (Hemminki, 1993). Een schematische voorstelling van het gehele proces wordt gegeven in figuur 1.1. Wanneer we de structuur en de functie van de DNA-molecule bekijken is het evident dat vooral de modificaties ter hoogte van de purine- en pyrimidinebasen, en in bijzonder de modificaties ter hoogte van de atomen betrokken in de waterstofbrugvorming, aanleiding kunnen geven tot de incorporatie van mutaties tijdens de DNA-replicatie (Basu en Essigmann, 1988).

Het gebruik van vectoren met specifiek ingebouwde adducten heeft aangetoond dat adducten een pro-mutagene rol spelen in zoogdiercellen. De resultaten van die onderzoeken tonen aan dat de adductvorming niet willekeurig gebeurt maar een voorkeur vertoont voor bepaalde DNA-sequenties. Ook de daaropvolgende mutaties vertonen dus sequentiespecificiteit (mutatie “hot spots”) (Hemminki, 1993). Verder toonden deze experimenten ook een sterk verschil aan in mutatie-efficiëntie van de DNA-adducten, sommige adducten veroorzaken slechts sporadisch een mutatie terwijl anderen dit heel frequent doen. Hemminki besluit in 1993 dat het bewijs geleverd is dat vele, zometer de meeste, adducten aanleiding kunnen geven tot mutaties. Uit die onderzoeken blijkt bovendien dat de mutaties meestal optreden op die plaatsen waar zich nucleotiden bevinden waarvan bekend is dat ze met de adductvormer reageren (Harris, 1991).

Herstel van DNA-adducten hangt af van een aantal factoren waaronder het

type van het adduct. Onderzoek wees uit dat in de HPRT-genen van verschillende celculturen bepaalde adducten sneller verwijderd worden wanneer ze zich in het gen bevinden dan wanneer ze zich in het niet-coderend gebied dicht bij het gen bevinden en sneller wanneer ze zich op de overgeschreven streng bevinden dan op de niet-overgeschreven streng (Hemminki, 1993). Een verklaring voor dit fenomeen werd echter niet gegeven in de literatuur. Een mogelijke verklaring kan zijn dat de herstelmechanismen slechts in werking treden wanneer de transcriptie van de getroffen DNA-sequentie uitgevoerd wordt.



Hier dient ook vermeld te worden dat mutaties spontaan kunnen optreden, waarbij wordt aangenomen dat de oorzaak niet altijd de aanwezigheid van een adduct is. Een mogelijke bijdrage aan deze spontane mutaties kan geleverd worden door de deaminatie- en depurinatiereacties die steeds aanwezig zijn. Verder is ook algemeen bekend dat in ons lichaam een aantal endogene stoffen aanwezig zijn die

kunnen binden met DNA en zo mutaties kunnen veroorzaken, denken we hierbij bijvoorbeeld aan hydroxylradicalen.

1.1.2. Het verband tussen DNA-adducten en het ontstaan van kanker

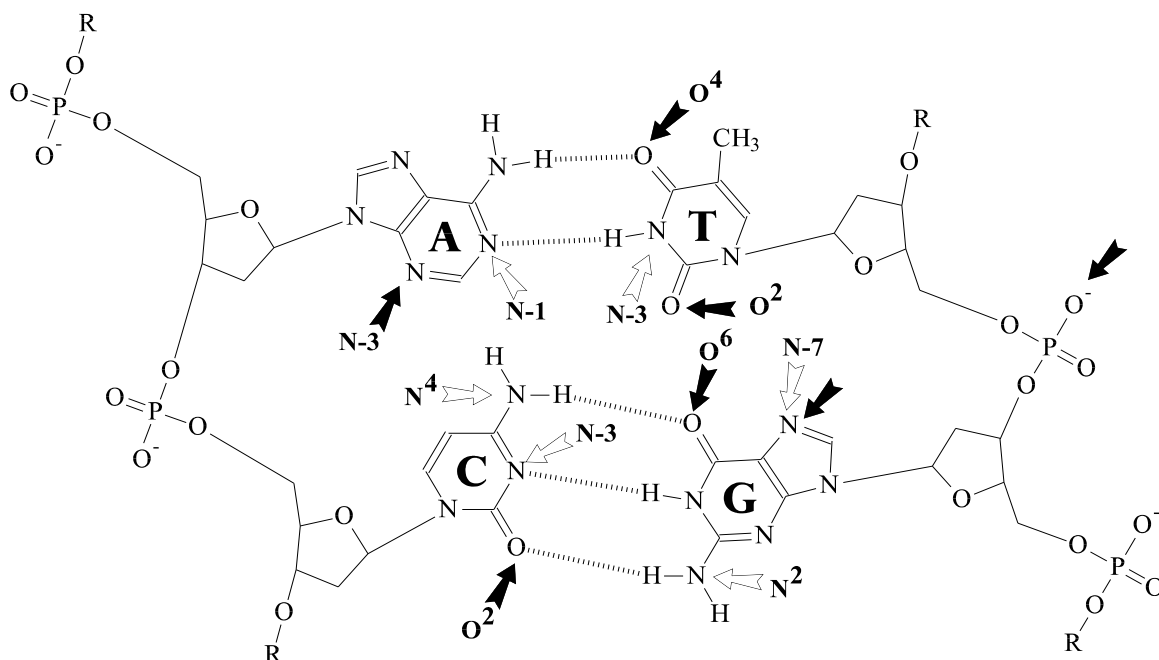
Onderzoek naar de relatie van DNA-adductniveaus in doel- en niet-doelweefsels in diermodellen tot gekende tumorresponsen liet toe een beter inzicht te bekomen in de rol van DNA-adducten. DNA-adducten worden normaliter teruggevonden zowel in de doel- als in de niet-doelweefsels, wat erop wijst dat niet enkel de adduct verantwoordelijk is voor de weefselspecificiteit van de tumor (Perera, 1988). De hoeveelheid DNA-adducten die gevormd wordt blijkt over een groot dosis interval een lineair verband te vertonen met de toegediende dosis, onafhankelijk van het al dan niet optreden van tumoren in het weefsel (Beland et al., 1988). Voor de meeste van de door hun geteste componenten vonden Poirier en Beland (1992) een goede correlatie tussen het niveau van de adductvorming en de tumorontwikkeling waaruit ze besluiten dat: “de graad van DNA-adductvorming meestal zal correleren met de graad van tumorigenese”. Bovendien blijkt de stabiliteit van de gevormde DNA-adducten verband te houden met de kans dat tumoren gevormd worden. Hoe langzamer de herstelling gebeurt hoe hoger de kans om tumoren te ontwikkelen (Richardson et al., 1987; Swenberg et al., 1984). Ook bleek in sommige gevallen de hoeveelheid DNA-adducten in de doelweefsels van gevoelige dieren hoger te liggen dan de DNA-adducten in dezelfde weefsels van resistente dieren (Wogan en Gorelick, 1985).

Uit al deze experimenten blijkt eveneens dat er geen eenvoudig algoritme kan opgeschreven worden om aan de hand van de hoeveelheid DNA-adducten het risico op het ontwikkelen van een tumor in een bepaald weefsel te bepalen (Hemminki, 1993).

Verder blijkt de plaats van de gevormde adduct belangrijk te zijn voor de carcinogeniteit van een genotoxische component. Zo blijkt er voor methylerende en ethylerende adductvormers en voor vele andere kleine alkylerende producten een betere correlatie te bestaan tussen de graad van guanine O⁶ alkylatie en carcinogeniteit dan tussen de graad van guanine N-7 alkylatie en carcinogeniteit

(Bartsch et al., 1988). Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de N-7 positie niet rechtstreeks betrokken is in de waterstofbrugvorming in het DNA (Van den Eeckhout, 1991). Daartegenover staat dan weer dat vele krachtige, grote carcinogenen binden op de N-7 positie van guanine (Hemminki et al., 1986). Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de N-7 alkylation met grote adducten onrechtstreeks de waterstofbrugvorming in het DNA verstoort, bvb. door sterische effecten.

De plaats-selectiviteit van de DNA-adductvorming wordt door verschillende factoren bepaald. In eerste instantie wordt de beschikbaarheid voor alkylation bepaald door het nucleofiel karakter van de atomen en de elektronendichtheid van de plaatsen (Pullman en Pullman, 1980), in combinatie met conformationele aspecten (Lipetz et al., 1982). De graad van DNA-adductvorming op een bepaalde plaats zal ook sterk afhangen van de eigenschappen van het genotoxische product. In figuur 1.2 zijn de mogelijke alkyleringsposities aangegeven voor PGE (Van den Eeckhout, 1991) en voor ethylnitrosoarea (Richardson et al., 1987).



1.1.3. Het verband tussen het optreden van mutaties en het ontstaan van kanker

De mutationele theorie van kanker bestaat reeds lang, maar de bewijzen die

deze theorie onderbouwen zijn nog maar relatief recent geleverd. Een eerste bewijs werd geleverd door de observatie van chromosomale afwijkingen die gerelateerd bleken te zijn met een verhoogd risico op kanker. Ook het aantonen van specifieke chromosomale afwijkingen bij bepaalde tumoren wees op het oorzakelijk verband met mutaties. Meer recentelijk werd door het in kaart brengen van chromosomale afwijkingen, zoals de translokatie tussen de chromosomen 22 en 9 in chronische myeloïde leukemie, aangetoond dat belangrijke groei-controlerende genen (en oncogenen) gelokaliseerd zijn op het getranslokaliseerde DNA (Croce, 1987). Onderzoek naar retinoblastoma toonde het bestaan aan van nog een klasse van groei-controlerende genen meer bepaald de anti-oncogenen (Bishop, 1991). Mutaties die de functie van de twee allelen van het retinoblastoma-gen tenietdoen resulteren in tumor vorming.

Er wordt vooropgesteld dat oncogenen kunnen geactiveerd worden door het optreden van punt-mutaties, translokaties en amplificaties terwijl aangenomen wordt dat tumor suppressor-genen gedeactiveerd worden door punt-mutaties en deleties (Bishop, 1991; Aaronson, 1991).

Men heeft aangetoond dat punt-mutaties een belangrijke rol spelen in de activering van de *ras* en de *neu* oncogenen (Hemminki, 1993). Mutatie van het *ras*-gen wordt teruggevonden in vele types van menselijke kankers, vooral in pancreas-, long- en colontumoren (Aaronson, 1991), terwijl mutatie van het *neu*-gen vooral teruggevonden wordt in borstkanker (Balmain en Brown, 1988). Er werd bovendien aangetoond dat mutaties van deze genen bij proefdieren geïnduceerd konden worden door het toedienen van N-nitroso-verbindingen, vinylchloride, aflatoxine B1, tetranitromethaan, polycyclische aromatische hydrocarbonaten (PAH's), benzidine derivaten, urethaan en ioniserende straling (Harris, 1991). Het sterkste bewijs dat een verband aantoonde tussen adducten, mutaties en kanker werd geleverd door het *p53*-gen, waarvan specifieke mutaties blijken aanwezig te zijn in de levertumoren van bevolkingsgroepen waarvan aangenomen wordt dat ze grote hoeveelheden aflatoxine B1 innemen (Harris, 1991; Hollstein, 1991). Zo niet nog sterker bewijs werd geleverd in het onderzoek naar het verband tussen DNA-adducten ten gevolge van UV-licht en huidkanker. Dit UV-licht

veroorzaakt typische tandem-dipyrimidinemutaties in eukariotische systemen. In 35 tumoren veroorzaakt door bestraling van de huid van proefdieren met UV-B werden bij zeven tumoren mutaties gevonden in het *p53*-gen, alle gelokaliseerd op tandem-dipyrimidines (Kress et al., 1992).

1.1.4. Besluit

Het is duidelijk dat bepaalde chemicaliën kanker kunnen veroorzaken door DNA-adductvorming en daaropvolgende mutaties in bepaalde genen. Het feit dat niet alle DNA-adducten resulteren in kankervorming kan verklaard worden doordat slechts mutaties in bepaalde genen aanleiding geven tot de ontwikkeling van tumoren. Het verband tussen DNA-adducten en kankervorming kan dus aanzien worden als een kansspel: als de DNA-adduct toevallig op een gen gevormd wordt dat instaat voor de regulatie van de celproliferatie kan dit resulteren in de ontwikkeling van een tumor. Het is eveneens zo, net als bij een kansspel, dat hoe meer DNA-adducten gevormd worden hoe groter de kans wordt om een tumor te ontwikkelen. Het is dus belangrijk dat alle genotoxische componenten geïdentificeerd worden en dat onderzoek verricht wordt naar hun reactiemechanisme leidend tot DNA-adductvorming.

I.2. DNA-adductvorming van epoxiden

I.2.1. Inleiding

Epoxiden worden gebruikt als industriële en laboratorium chemicaliën omdat ze dankzij de hoge reactiviteit van de epoxide-ring bijzonder geschikt zijn als alkylerings- of crosslinking-reagentia (Manson, 1980) bij organische syntheses. Het meest eenvoudige epoxide dat in 1859 voor het eerst bereid werd door Wurtz, zijnde ethyleenoxide, wordt heden ten dage frequent gebruikt om chirurgisch en ander materiaal te steriliseren. De belangrijkste karakteristieken van epoxiden zijn het gevolg van hun elektrofiel en lipofiel karakter en de hoge reactiviteit van de epoxide-ring. Deze epoxide-ringopeningsreacties zijn het gevolg van een nucleofiele aanval van componenten met -NH_2 -, hydroxyl- of thiolgroepen. Deze eigenschappen die ze voor de chemische industrie zo interessant maken, zijn er echter eveneens voor verantwoordelijk dat vele epoxiden mutageen en carcinogeen zijn (Manson, 1980). Het grootste gevaar voor blootstelling lopen dan ook de arbeiders of het laboratoriumpersoneel die in contact komen met deze epoxiden.

Daarnaast kunnen epoxiden ook in ons milieu voorkomen door lucht-, water-, bodem- en voedselverontreiniging met bijvoorbeeld niet-biodegradeerbare

pesticiden. Sommige van deze pesticiden zijn epoxiden of worden in de bodem omgezet tot epoxiden, zoals bijvoorbeeld epoxidediëldrine. Verhitten van plantaardige oliën, zoals frituren, kan ook aanleiding geven tot de vorming van epoxiden (Manson, 1980) en daarenboven bevatten sommige plantaardige oliën natuurlijke epoxiden.

Bovendien toonde de groep van Boyland in 1950 aan dat epoxiden ook gevormd konden worden door metabolisatie van vreemde componenten in dieren (Garner, 1976). Veel onderzoek omtrent epoxidevorming en toxiciteit werd uitgevoerd rond het metabolisme van PAH's, die wijdverspreid voorkomen als milieucontaminanten. Een literatuurstudie over de periode 1980-1995 resulteerde in 2391 referenties over dit onderwerp. Het is nu algemeen aanvaard dat een epoxidemetaboliet verantwoordelijk is voor de mutageniteit van PAH's (Min et al., 1996). Eén van de meest bestudeerde PAH's is het benzo[a]pyreen, en vele rapporten tonen aan dat zijn diol-epoxidemetaboliet verantwoordelijk is voor de carcinogeniteit (Cooper et al., 1983; Van den Eeckhout, 1991). De zeer uitgebreide literatuur die beschikbaar is over deze PAH's zal hier niet verder besproken worden vermits deze stoffen niet het onderwerp uitmaken van dit werk. In contrast daarmee staan de eenvoudige epoxiden die slechts in beperkte mate onderzocht werden. Een literatuurstudie over de periode 1980-1995 resulteerde in slechts dertig referenties handelend over het onderzoek naar de DNA-adductvorming van eenvoudige epoxiden. Het was dan ook één van de doelstellingen van onze onderzoeksgroep meer inzicht te bekomen in de interactie van deze eenvoudige epoxiden met DNA. Als modelcomponenten voor dit onderzoek werden de glycidylethers geselecteerd (Van den Eeckhout et al., 1991b; Lemièrre et al., 1993; Vanhoutte et al., 1995; Lemièrre et al., 1996; Vanhoutte et al., 1997). Uit de groep van de glycidylethers werd fenylglycidylether geselecteerd als modelcomponent van dit werk.

Verder dient opgemerkt te worden dat ook de metabolisatie van een aantal geneesmiddelen aanleiding geeft tot de vorming van epoxidemetabolieten (Van den Eeckhout, 1991).

1.2.2. Fenylglycidylether (PGE)

Glycidylethers, met de gemeenschappelijke structuurformule weergegeven in figuur 1.3, behoren eveneens tot de groep van de epoxiden en worden veelvuldig aangewend als alkyleringsreagens in de industrie en het laboratorium. Ze vinden vooral toepassing in epoxyharssystemen, vooral het bis-fenol-A-diglycidylether (BPADGE) is een belangrijke reactieve component in epoxyharsen. Tijdens het uitharden van deze harsen gaan de epoxidegroepen covalente bindingen vormen waardoor in het uitgeharde hars normaliter geen glycidylethers meer aanwezig zijn (NIOSH, 1978). Epoxyharsen op basis van glycidylethers vinden vooral toepassing als beschermende coatings, versterkte plastics en in adhesieven.

De NIOSH schatte dat in 1978 in de VS zo'n 118000 arbeiders blootgesteld werden aan glycidylethers.

PGE dat deel uitmaakt van deze groep word vooral aangewend als reactief onderdeel in de verdunners van epoxyharssystemen, als stabilisator van gehalogeneerde componenten en in de polymeerindustrie om de eigenschappen van synthetische vezels te verbeteren. PGE wordt ook aangewend in de geneesmiddelenindustrie als uitgangsmateriaal in de organische synthese van β -blokkers. De NIOSH schatte dat in 1978 zo'n 8000 arbeiders in de VS blootgesteld werden aan PGE.

1.2.2.1. Toxiciteit van PGE

Het meest algemene effect van epoxiden in mensen ten gevolge van occasionele blootstelling is primaire irritatie van de epithelia (huid, ademhalingswegen, epithelia van het gastro-intestinaal systeem en de conjunctivae) en PGE veroorzaakt evenals andere glycidylethers contactdermatitis (Holness en Nethercott, 1993; Angelini et al., 1996). Pulmonaire irritatie kan ontstaan door inhalatie van de meer vluchtige epoxiden en kan resulteren in pulmonair oedeem en pneumonie (Manson, 1980).

Een PGE-inhalatiestudie bij ratten en honden (Terrill et al., 1982) rapporteert geen schadelijke effecten, behalve een milde vorm van alopecie. Huidirritatie werd aangeduid als de oorzaak van deze alopecie. PGE veroorzaakte geen significante verschillen in de reproductieparameters (vruchtbaarheid, aantal jongen en overleving, lactatie). Blootstelling van zwangere ratten aan PGE resulteerde niet in embryotoxische of teratogene effecten. Een andere studie (Fishbein, 1981) rapporteert de vorming van nasale tumoren in ratten na langdurige inhalatie van PGE.

Greene et al. (1979) testte de *in-vitro* mutageniteit en celtransformatie van PGE ten opzichte van bacteriën en zoogdiercellijnen. Een concentratie-afhankelijke mutageniteit werd aangetoond in de *Salmonella typhimurium* lijnen TA 1535 en TA 100, met en zonder toevoeging van rat S9, maar niet in de lijnen TA 98, TA 1537 en TA 1538. Deze resultaten suggereren dat PGE

een direct werkend mutagen is dat base-substituties veroorzaakt. Alhoewel PGE geen 6-thioguanine resistente mutanten veroorzaakt in ovariumcellijnen van de Chinese hamster bleek het toch sterk cytotoxisch te zijn. De afwezigheid van mutagene activiteit in deze cellijn kon niet verklaard worden, des te meer omdat twee andere *in-vitro* testen wel positieve resultaten opleverden. Zo werd een dosisafhankelijke SA7-virustransformatie-efficiëntie van primaire hamster-embryocellen waargenomen en bleek PGE in staat om secundaire hamster embryo-cellen chemisch te transformeren. Beide testen werden uitgevoerd in de aanwezigheid van serum in het medium, wat aantoont dat zelfs in de aanwezigheid van extracellulaire proteïnen PGE in staat is om de cel te penetreren en bij het genetisch materiaal te komen in een reactieve vorm.

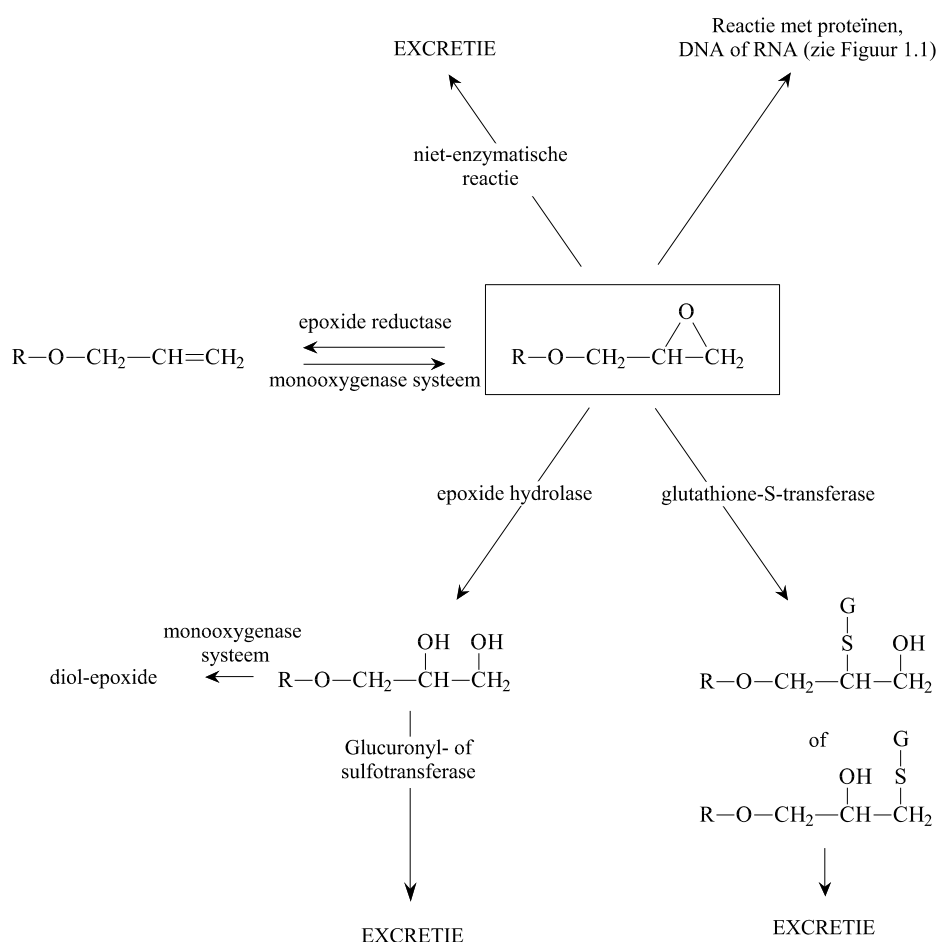
Bovendien bleek PGE ook actief te zijn in een gastgemedieerde mutageniteitstest wat suggereert dat PGE ook een potentieel *in-vivo* genotoxisch gevaar vormt en dus een potentieel menselijk carcinogeen is.

Onder de biologische gevolgen van blootstelling aan glycidylethers maakt het NIOSH (NIOSH, 1978) geen melding van carcinogene of mutagene effecten bij de mens maar besluit als volgt: "Resultaten van verschillende laboratoria laten vermoeden dat sommige glycidylethers in staat zouden kunnen zijn om testiculaire atrofie en afwijkingen in het bloedbeeld te veroorzaken in verschillende soorten laboratoriumdieren, alhoewel geen van de rapporten uitsluitsel geeft daar sommige van de waargenomen afwijkingen het gevolg kunnen zijn van andere problemen. Gezien het NIOSH niet op de hoogte is van enige studie over het optreden van die afwijkingen bij mensen, stelt het dat het mogelijk optreden van die afwijkingen bij de mens voorzichtigheid gebied." Het internationaal agentschap voor kankeronderzoek (IARC) catalogeert PGE bij groep 2B, zijnde "mogelijk menselijk carcinogeen" (IARC, 1989).

1.2.2.2. Metabolisatie van PGE

Wanneer PGE of een ander epoxide in ons lichaam terechtkomt dan treden een aantal detoxificatiemechanismen in werking (zie figuur 1.4). De twee meest belangrijke detoxificatiereacties worden gekatalyseerd door de twee enzymen

epoxidehydrolase en glutathione-S-transferase. Alhoewel de diol-producten over het algemeen minder toxisch zijn en meer hydrofiel dan het overeenkomstige epoxide, kunnen de diolen van sommige PAH's voldoende lipofiel zijn om verder als substraat te fungeren voor het mono-oxygenase systeem dat ze omzet in diol-epoxiden, waarvan nu algemeen wordt aangenomen dat dit de uiteindelijke genotoxische metaboliet is voor vele PAH's (Manson, 1980).



Glutathionconjugatie is de belangrijkste detoxificatiereactie voor PGE (Van den Eeckhout, 1991).

1.2.2.3. Reglementering en blootstellingslimieten

Gezien de mogelijks negatieve gevolgen van blootstelling aan PGE werden door een aantal instanties blootstellingslimieten opgesteld ter bescherming

van de volksgezondheid. Enkele van deze voorschriften staan bij wijze van voorbeeld vermeld in tabel 1.1.

TABEL 1.1: Blootstellingslimieten voor PGE (IARC, 1989).

Instantie	Blootstellingslimiet
België	60 mg/m ³ gemiddeld gedurende 8 uur
OSHA (VS)	60 mg/m ³ gemiddeld gedurende 8 uur
NIOSH (VS)	5 mg/m ³ maximum gedurende 15 minuten
ACGIH (VS)	6 mg/m ³ gemiddeld gedurende 8 uur

I.3. Toepassingen in de chemotherapie

Chemotherapeutica zijn gedurende de voorbije halve eeuw het wapen bij uitstek geworden in de behandeling van allerhande tumoren. Er zijn dan ook heel wat chemotherapeutica ontwikkeld in die periode (Nogrady, 1988). Een belangrijke groep van die chemotherapeutica zijn de alkylerende agentia die kovalente bindingen aangaan met DNA en zodoende DNA-adducten vormen (Hemminki et al., 1994; Pauwels et al., 1995). Algemeen wordt aangenomen dat de potentie om DNA-adducten te vormen gerelateerd is met het cytotoxisch effect van deze stoffen (Hemminki et al., 1994) en dat de gevormde DNA-adducten zorgen voor het cytotoxisch of anti-neoplastische effect. De eerst ontdekte stoffen met anti-tumor activiteit waren de stikstofmosterds, die voortvloeiden uit de klinische observaties van de slachtoffers van de mosterdgasaanvallen gedurende de Eerste Wereldoorlog. De groep van de alkylerende agentia werd sedertdien aangevuld met talrijke nieuwe componenten zoals de nitrosoureas (Carter et al., 1988), de ethylenimines (Musser et al., 1992), cisplatina (Wang et al., 1996) en mitomycine C (Hoorn et al., 1995) die meer complexe wijzigingen aanbrengen in het DNA. Ook deze stoffen gaan kovalente bindingen aan met DNA tot vorming van DNA-adducten. Stoffen die DNA-adducten vormen kunnen dus bruikbaar zijn als chemotherapeutica. In dit opzicht werden door ons een aantal nieuwe platinaverbindingen onderzocht (Kokotos et al., 1997). Daarom zal in deze inleiding nog iets dieper ingegaan worden op de component waarop deze nieuwe platinaverbindingen gebaseerd zijn: cisplatina.

I.3.1. De ontdekking en de ontwikkeling van platinaverbindingen

Sedert de eerder toevallige ontdekking van het anti-neoplastisch effect van platinaverbindingen door Rosenberg in 1965, werden cisplatina (cis-diaminedichloor-platinum(II)) en carboplatina (cis-diamine-1,1-cyclobutaandicarboxylaatplatinum(II)) succesvol aangewend in de behandeling van tumoren. Ze worden vooral ingezet in de behandeling van ovarium-carcinomen, longkankers, hoofd- en nektumoren, kankers van de

urineblaas en testis-carcinomen (Cornelison en Reed, 1993; Yarema et al., 1994). Het klinisch gebruik van cisplatina is echter beperkt ten gevolge van de ernstige bijwerkingen: nefrotoxiciteit (Cornelison en Reed, 1993), ototoxiciteit, neurotoxiciteit en ernstige nausea en braken (Boogerd et al., 1990; Blommaert et al., 1995). Een bijkomend klinisch probleem wordt gevormd door de primair-resistente tumoren en het ontwikkelen van een secundaire resistentie van tumoren bij langdurige behandeling (Sai et al., 1996). Teneinde het hoofd te bieden aan deze tekortkomingen werden vele cisplatinaderivaten gesynthetiseerd (een recent overzichtsartikel werd gepubliceerd door Reedijk, 1996) met een tweeledig doel: enerzijds het verlagen van de toxiciteit en anderzijds om resistentie te overkomen. Het is in die optiek dat ons onderzoek naar een aantal nieuwe platinaverbindingen, gesynthetiseerd door de groep van Professor Kokotos, werd uitgevoerd.

I.4. Doelstellingen

Het onderzoek naar DNA-adducten is dus vanuit twee opzichten belangrijk, enerzijds is het noodzakelijk dat er onderzoek verricht wordt naar DNA-adducten die gevormd worden door chemische carcinogenen waaraan we blootgesteld kunnen worden en anderzijds is het onderzoek naar DNA-adductvorming van chemotherapeutica evenzeer van wezenlijk belang. Teneinde meer inzicht te kunnen bekomen omtrent het werkingsmechanisme van deze DNA-adductvormers is het noodzakelijk om analysemethodologieën te ontwikkelen die structuuridentificatie van de gevormde DNA-adducten mogelijk maakt. Daarnaast dient een analysemethodologie voldoende gevoelig te zijn om bruikbaar te zijn voor het onderzoek naar DNA-adducten. Bij de aanvang van deze doctoraatsthesis werd het leeuwendeel van het DNA-adduct onderzoek uitgevoerd met behulp van de ^{32}P -postlabeling techniek (Farmer, 1994; Försti et al., 1994) die ontwikkeld werd door Randerath et al. in 1981. Deze techniek beschikt over een extreme gevoeligheid, maar geeft weinig tot geen structurele informatie over de adducten. De hoofddoelstelling van deze doctoraatsthesis was het ontwikkelen van een analysemethodologie, gebaseerd op de koppeling van capillaire zone elektroforese (CZE) aan massaspectrometrische detectie, voor de bepaling van DNA-adducten. De koppeling van beide technieken dient voldoende structuurinformatie te verschaffen om identificatie mogelijk te maken en dit met een adequate gevoeligheid om *in vitro* onderzoek op DNA-niveau mogelijk te maken.

Een eerste doelstelling was het op punt stellen van een CZE-scheiding voor de analyse van de adducten gevormd door PGE met de 5'-monofosfaatnucleotiden en met kalfthymus DNA. Teneinde de adducten aanwezig in de enzymatische DNA-hydrolysaten te kunnen detecteren werd een *on-line* concentratie toegepast, waarbij de staalcomponenten rechtstreeks op het capillair werden geconcentreerd. Naar deze techniek zal verder met de Engelse term "sample stacking" gerefereerd worden. Dit onderzoek wordt beschreven in Hoofdstuk II.

Bij aanvang van deze doctoraatsthesis stond de koppeling van CZE met elektropray massaspectrometrie (ES-MS) nog in zijn kinderschoenen. Een tweede

doelstelling van dit werk was dan ook het optimaliseren van de *on-line* koppeling tussen CZE en ES-MS (CZE-ES-MS) voor de bepaling van DNA-adducten en tandem massaspectrometrie (CZE-ES-MS/MS) teneinde de structuur van de gevormde DNA-adducten op te helderen. Bovendien waren wij de eersten om de "sample stacking"-techniek toe te passen in combinatie met CZE-ES-MS (Deforce et al., 1996) om zodoende de gevoeligheid van de techniek met een factor honderd te verhogen. Een gedetailleerde beschrijving van dit werk wordt gegeven in Hoofdstuk III.

Gebruik makende van de ontwikkelde CZE-ES-MS en CZE-ES-MS/MS techniek werd onze derde doelstelling, het onderzoek naar de interactie tussen PGE en DNA, gerealiseerd. Daartoe werd de structuur van de DNA-adducten van PGE met, als referentiecomponenten, de 5'-monofosfaatnucleotiden (Hoofdstuk IV) en kalfthymus DNA opgehelderd (Hoofdstuk V). Zodoende werd getracht een beter inzicht te bekomen in de schade die PGE aanricht aan ons genetisch materiaal. Vernieuwend in ons onderzoek was dat de eventueel gevormde fosfaatadducten niet uit het oog verloren werden, waar het leeuwendeel van het DNA-adductonderzoek zich toespitst op de base-adducten. Zoals blijkt uit Hoofdstuk V zijn deze fosfaatadducten en de daarmee gepaard gaande hydrolyse van de DNA-streng hoogst waarschijnlijk verantwoordelijk voor de ultieme schade die PGE toebrengt aan ons erfelijk materiaal (Deforce et al., 1998; Deforce et al., 1998b).

Het tweede luik van dit doctoraatsonderzoek spitste zich toe op het onderzoek naar een nieuwe groep van vijf aminocoumarineplatina(II)verbindingen (Kokotos et al., 1997). Dit onderzoek wordt beschreven in Hoofdstuk VI. Een eerste doelstelling in dit onderzoek was nagaan in welke mate de aminocoumarineplatina(II)verbindingen cytotoxisch waren. Dit onderzoek werd *in vitro* uitgevoerd met behulp van de MTT-test op drie verschillende cellijnen, waaronder één cellijn die resistentie vertoonde tegen behandeling met cisplatina. Een volgende doelstelling was het nagaan of, in analogie met cisplatina, de actieve aminocoumarineplatina(II)verbindingen ook in verband konden gebracht worden met de vorming van DNA-adducten. Teneinde dit onderzoek mogelijk te maken werd preparatieve CZE uitgevoerd in combinatie met atomaire absorptie detectie van

platina. Deze combinatie was op dat ogenblik nog nooit uitgevoerd (Deforce et al., 1998c). Een laatste doelstelling was het bepalen van het reactiemechanisme dat leidde tot de vorming van de platina-DNA-adducten. Daartoe werden de reactieproducten van één van de actieve aminocoumarineplatina(II)verbindingen en een synthetisch oligonucleotide bestudeerd met een daarvoor ontwikkelde *on-line* koppeling tussen CZE en “Time of Flight” (TOF) massaspectrometrie (Deforce et al., 1998d).

I.5. Referenties

- Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science*. 1991, 254, 1146-1153.
- Angelini G, Rigano L, Foti C, Grandolfo M, Vena GA, Bonamonte D, Soleo L and Scorpiniti AA. Occupational sensitization to epoxy resin and reactive diluents in marble workers. *Contact Dermatitis*. 1996, 35, 11-16.
- Balmain A and Brown K. Oncogene activation in chemical carcinogenesis. *Adv. Cancer Res*. 1991, 51, 147-182.
- Bartsch H, Hemminki K and O'Neill JK (ed.), *Methods for detecting DNA damaging agents in humans: applications in cancer epidemiology and prevention*. IARC, Lyon, France, 1988.
- Basu AK and Essigmann JM. Site-specifically modified oligonucleotides as probes for the structural and biological effects of DNA-damaging agents. *Chem. Res. Toxicol*. 1988, 1, 1-18.
- Beland FA, Fullerton NF, Kinouchi T and Poirier MC. DNA adducts formation during continuous feeding of 2-acetylaminofluorene at multiple concentrations. In Bartsch H, Hemminki K and O'Neill JK (ed.), *Methods for detecting DNA damaging agents in humans: applications in cancer epidemiology and prevention*. IARC, Lyon, France, 1988, 175-180.
- Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 1991, 64, 235-248.
- Blommaert FA, van Dijk-Knijnenburg HCM, Dijt FJ, den Engelse L, Baan RA, Berends F and Fichtinger-Schepman AMJ. Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells. *Biochemistry*. 1995, 34, 8474-8480.
- Boogerd W, ten Bokkel Huinck WW, Dalesio O, Hoppenbrouwers WJJF and van der Sande JJ. Cisplatin-induced neuropathy: central, peripheral and autonomic nerve involvement. *J. Neuro-Oncol*. 1990, 9, 255-263.
- Carter CA, Kirk MC and Ludlum DB. Phosphotriester formation by the haloethylnitrosoureas and repair of these lesions by *E.coli* BS21 extracts. *Nucleic Acids Res*. 1988, 16, 5661-5672.
- Cooper CS, Grover PL and Sims P. The metabolism and activation of benzo[a]pyrene. In Bridges JW and Chasseaud (ed.), *Progress in drug metabolism*. Vol. 7., Wiley Interscience, 1983, 295-382.

- Cornelison TL and Reed E. Review: Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin and ormaplatin. *Gynecol. Oncol.* 1993, 50, 147-158.
- Croce CM. Role of chromosome translocations in human neoplasia. *Cell.* 1987, 49, 155-156.
- Deforce DLD, Ryniers FPK, Lemière F, Esmans E and Van den Eeckhout EG. Analysis of DNA adducts in DNA hydrolysates by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1996, 68, 3575-3584.
- Deforce DLD, Lemière F, Esmans EL, De Leenheer A and Van den Eeckhout EG. Analysis of the DNA damage induced by phenyl glycidyl ether using capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1998, 258, 331-338.
- Deforce DLD, Lemière F, Hoes I, Millecamps REM, Esmans EL, De Leenheer A and Van den Eeckhout EG. Analysis of the DNA adducts of phenyl glycidyl ether in a calf thymus DNA hydrolysate by capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry: evidence for phosphate alkylation. *Carcinogenesis.* 1998b, 19, 1077-1086.
- Deforce DLD, Kokotos G, Esmans EL, De Leenheer A en Van den Eeckhout EG. Preparative capillary zone electrophoresis in combination with off-line graphite furnace atomic absorption for the analysis of DNA complexes formed by a new aminocoumarine platinum(II) compound. *Electrophoresis.* 1998c, 19, 2454-2458.
- Deforce DLD, Raymackers J, Meheus L, Van Wijnendaele F, De Leenheer A and Van den Eeckhout EG. Characterization of DNA oligonucleotides by coupling of capillary zone electrophoresis to electrospray ionization Q-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1998d, 70, 3060-3068.
- Farmer PB. Carcinogen adducts: Use in diagnosis and risk assessment. *Clin. Chem.* 1994, 40/7, 1438-1443.
- Fishbein L. Carcinogenicity and mutagenicity of solvents, Glycidyl ethers, dioxane, nitroalkanes, dimethylformamide and allyl derivatives. I. *Sci. Total Environ.* 1981, 17, 97-110.
- Försti A, Staffas J and Hemminki K. Comparison of TLC- and HPLC-³²P-postlabelling assay for cisplatin-DNA adducts. *Carcinogenesis.* 1994, 15, 2829-2834.
- Garner RC. The role of epoxides in bioactivation and carcinogenesis. In

Bridges JW and Chasseaud (ed.), Progress in drug metabolism. Vol. 1., Wiley Interscience, 1976, 87-90.

- Greene EJ, Friedman MA, Sherrod JA and Salerno AJ. In vitro mutagenicity and cell transformation screening of phenylglycidyl ether. Mutat. Res. 1979, 67, 9-19.

- Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res. Suppl.* 1991, 51, 5023-5044.
- Hemminki K. Nucleic acid adducts of chemical carcinogens and mutagens. *Arch Toxicol.* 1983, 52, 249-285.
- Hemminki K, Försti A, Mustonen R and Savela K. DNA adducts in experimental cancer research. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 1986, 112, 181-188.
- Hemminki K. DNA adducts, mutation and cancer. *Carcinogenesis.* 1993, 14, 2007-2012.
- Hemminki K, Dipple A, Shuker DEG, Kadlubar FF, Segerback D and Bartsch H (ed.), DNA adducts; identification and biological significance. IARC, Lyon, France, 1994.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC. *p53* mutations in human cancers. *Science.* 1991, 253, 49-53.
- Holness DL and Nethercott JR. The performance of specialized collections of bisphenol A epoxy resin system components in the evaluation of workers in an occupational health clinic population. *Contact Dermatitis.* 1993, 28, 216-219.
- IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some organic solvents, resin monomers and related compounds, pigments and occupational exposures in paint manufacture and painting. Vol. 47., IARC, Lyon, France, 1989.
- Karran P and Lindahl T. Cellular defence mechanisms against alkylating agents. *Cancer Surv.* 1985, 4, 585-589.
- Kokotos G, Theodorou V, Tzougraki C, Deforce D en Van den Eeckhout E. Synthesis and *in-vitro* cytotoxicity of aminocoumarin platinum(II) complexes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 7/17, 2165-2168.
- Kress S, Sutter C, Strickland PT, Mukhtar H, Schweitzer J and Schwarz M. Carcinogen-specific mutational pattern in the *p53* gene in ultraviolet B radiation-induced squamous cell carcinomas of mouse skin. *Cancer Res.* 1992, 52, 6400-6403.
- Lemièrre F, Esmans EL, Van Dongen W and Van den Eeckhout E. Evaluation of liquid chromatography-thermospray mass spectrometry in the determination of some PGE-2'-deoxynucleoside adducts. *J. Chromatogr. A.* 1993, 647, 211-218.

- Lemière F, Joos P, Vanhoutte K, Esmans EL, De Groot A, Claeys M and Van den Eeckhout E. Phenylglycidyl ether adducts of 2'-deoxycytidine and 2'-deoxyadenosine: stability in solution and structure analysis by electrospray tandem mass spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectr. 1996, 7, 682-691.

- Lipetz PD, Galsky AG and Stephens RE. Relationship of DNA tertiary and quaternary structure to carcinogenic processes. *Cancer Res.* 1982, 36, 165-210.
- Manson MM. Epoxides is there a human health problem? *Brit. J. Ind. Med.* 1980, 37, 317-336.
- Min Z, Gill RD, Cortez C, Harvey RG, Loechler EL and DiGiovanni J. Targeted A-T and G-T mutations induced by site-specific deoxyadenosine and deoxyguanosine adducts, respectively, from the (+)-anti-diol epoxide of dibenz[a,j]anthracene in M13mp7L2. *Biochemistry-US.* 1996, 35, 4128-4138.
- Musser SM, Pan S, Egorin MJ, Kyle DJ and Callery PS. Alkylation of DNA with aziridine produced during the hydrolysis of N,N',N'-triethylenethiophosphoramidate. *Chem. Res. Toxicol.* 1992, 5, 95-99.
- NIOSH. Criteria for a recommended standard occupational exposure to glycidyl ethers. US Department of health, Education and Welfare, Public health Service, Center for disease control, National Institute for occupational Safety on Health, Cincinnati. 1978. http://www.cdc.gov/niosh/79104_29.html
- Nogrady T. Nucleic acids as targets for drug action. In Nogrady T (ed.), *Medicinal chemistry: A biochemical approach.* Oxford University Press, New York, 1988, 407-428.
- Pauwels O, Atassi G and Kiss R. Combination of computerized morphonuclear and multivariate analyses to characterize in vitro the antineoplastic effect of alkylating agents. *J. Pharmacol. Toxicol.* 1995, 33, 35-45.
- Perera FP. The significance of DNA and protein adducts in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 1988, 205, 255-269.
- Perera FP, Hemminki K, Gryzbowska E, Motykiewicz G, Michalska J and Santella RM. Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland. *Nature.* 1992, 360, 256-258.
- Pitot HC and Dragan YP. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J.* 1991, 5, 2280-2286.
- Poirier M and Beland FA. DNA adduct measurements in tumour incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. *Chem. Res. Toxicol.* 1992, 5, 749-755.
- Pullman B and Pullman A. Nucleophilicity of DNA. Relation to chemical

carcinogenesis. In Pullman B, Ts'O POP and Gelboin H (ed.), Carcinogenesis, fundamental mechanisms and environmental effects. Reider D, Boston, 1980, 55-60.

- Randerath K, Reddy MV and Gupta RC. ^{32}P -postlabeling test for DNA damage. P. Natl. Acad. Sci. USA. 1981, 78, 6126-6129.
- Reedijk J. Improved understanding in platinum antitumour chemistry. Chem. Commun. 1996, 801-806.
- Richardson FC, Beauchamp RO and Swenberg JA. Properties and biological consequences of alkylpyrimidine deoxyribonucleosides. Pharmacol. Therapeut. 1987, 34, 181-213.
- Sai SI, Kumazawa H, Tachikawa T, Yamashita T and Kawamoto K. Alteration of sensitivity to *cis*-diamine(glycolate)-platinum(II) (254-S) in oral tumor xenografts following multiple applications. Int. J. Oncol. 1996, 8, 57-63.
- Skipper PL and Tannenbaum SR. Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens. Carcinogenesis. 1990, 11, 507-518.
- Swenberg JA, Dryoff MC, Bedell MA, Popp JA, Huh N, Kirstein U and Rajewsky MF. O^4 -ethyldeoxyguanosine, but not O^6 -ethyldeoxyguanosine, accumulates in hepatocyte DNA of rats exposed continuously to diethylnitrosamine. P. Natl. Acad. Sci. USA. 1984, 81, 1692-1695.
- Terrill JB, Lee KP, Culik R and Kennedy GL. The inhalation toxicity of phenylglycidyl ether: reproduction, mutagenic, teratogenic, and cytogenetic studies. Toxicol. Appl. Pharm. 1982, 64, 204-212.
- Tomatis L, Aito A, Wilbourn J and Shuker L. Human carcinogens so far identified. Jpn. J. Cancer Res. 1989, 80, 795-807.
- Van den Eeckhout EG. Development of analytical methodology in the structure-genotoxicity relationship of some aliphatic epoxides. Proefschrift voorgelegd tot het verkrijgen van de graad van Geaggregeerde voor het Hoger Onderwijs in de Farmaceutische Wetenschappen. Universiteit Gent. 1991.
- Van den Eeckhout E, Coene J, Claereboudt J, Borremans F, Claeys M, Esmans E and Sinsheimer JE. Comparison of the isolation of adducts of 2'-deoxycytidine and 2'-deoxyguanosine with phenylglycidyl ether by high-performance liquid chromatography on a reversed-phase column and a polystyrene-divinylbenzene column. J. Chromatogr. A. 1991b, 341, 317-331.
- Vanhoutte K, Joos P, Lemière F, Van Dongen W, Esmans EL, Claeys M and Van den Eeckhout E. Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry of the DNA adducts formed between 2'-deoxynucleosides and bisphenol A diglycidyl ether. J. Mass Spectrom. 1995, 30, 1453-1461.

-
- Vanhoutte K, Van Dongen W, Hoes I, Lemière F, Esmans EL, Van Onckelen H, Van den Eeckhout E, van Soest REJ and Hudson AJ. Development of nanoscale liquid chromatography/electrospray mass spectrometry methodology for the detection and identification of DNA adducts. *Anal. Chem.* 1997, 69, 3161-3168.
 - Wang K, Lu J and Li R. The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coordin. Chem. Rev.* 1996, 151, 53-88.
 - Wogan GN and Gorelick NJ. Chemical and biochemical dosimetry of exposure to genotoxic chemicals. *Environ. Health Persp.* 1985, 62, 5-18.
 - Yarema KJ, Wilson JM, Lippard SJ and Essigmann JM. Effects of DNA adduct structure and distribution on the mutagenicity of two platinum anticancer drugs. *J. Mol. Biol.* 1994, 236, 1034-1048.

Hoofdstuk II: Ontwikkeling en optimalisatie van een capillaire zone elektroforetische scheidingsmethode voor de bepaling van 5'-monofosfaatnucleotideadducten.

II.1. Literatuuroverzicht

II.1.1. Overzicht van de gebruikte analysemethodologieën op het vlak van DNA-adductonderzoek

Gezien de uitgebreidheid van het onderzoek dat uitgevoerd wordt op het vlak van DNA-adducten is het hier beschreven literatuuronderzoek beperkt tot deze studies die zich richten op het onderzoek van DNA-adducten van epoxiden en componenten die na metabolische activatie aanleiding geven tot epoxiden. Verder dient de hieronder beschreven evaluatie bekeken te worden vanuit de optiek dat DNA-adductonderzoek zal uitgevoerd worden op nucleotideniveau, *in vitro*.

Een belangrijke voorwaarde waaraan een analysemethodologie moet voldoen om bruikbaar te zijn op het vlak van DNA-adductonderzoek is dat de methode over een geschikte gevoeligheid dient te beschikken. Wanneer we willen evalueren of een techniek bruikbaar zal zijn voor het uitvoeren van *in-vivo* experimenten moeten we de volgende gegevens in acht nemen. In dieren behandeld met het te onderzoeken carcinogeen kan men stellen dat er op 10^5 ongemodificeerde nucleotiden één modificatie zal aanwezig zijn. Wetende dat uit 40 ml bloed ongeveer 500 µg DNA kan worden geïsoleerd, kan berekend worden dat men over 5 ng adduct zal beschikken.

II.1.1.1. De ^{32}P -postlabeling techniek

Deze techniek die in 1981 ontwikkeld werd door Randerath et al. wordt tot op heden, nog altijd gezien als de meest gevoelige techniek voor de detectie van DNA-adducten. In het beste geval kan hiermee één adduct aangetoond worden op 10^{10} - 10^{11} ongemodificeerde nucleotiden, wat overeenstemt met ongeveer 1 adduct per cel (Farmer, 1994). Deze techniek is heel versatiel en werd ondermeer aangewend om DNA-adducten aan te tonen van poly-aromatische koolwaterstoffen (Reddy et al., 1984; Chen et al., 1996), cisplatina (Försti et al., 1994) en aristolochiazuur (Schmeiser et al., 1996). Algemeen wordt het DNA gehydrolyseerd tot zijn deoxynucleoside 3'-monofosfaat bouwstenen, waarna deze bouwstenen omgezet worden in radioactief gemerkte 3',5'-bifosfaten door toevoegen van $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ en T_4 -polynucleotidekinase. Na TLC- of HPLC-scheiding van dit reactiemengsel volgt een detectie via scintillatie of Cerenkov-telling.

Deze techniek is bijzonder geschikt om blootstelling aan genotoxische carcinogenen aan te tonen (op *in vivo* en 'real world samples'). Het grootste nadeel van deze methode is echter dat ze weinig tot geen structurele informatie geeft van de adducten en dat slechts een tentatieve identificatie mogelijk is door het gebruik van synthetische referentie- componenten. Daardoor is deze methode van minder waarde voor het onderzoek naar de reactiemechanismen van genotoxische carcinogenen en identificatie van de gevormde adducten.

II.1.1.2. Immunologische technieken

Deze technieken (onder andere ELISA, USERIA en CRA) zijn eveneens voldoende gevoelig om adducten aan te tonen in *in-vivo* stalen (detectie van één adduct op 10^8 ongemodificeerde nucleotiden). Ze kunnen ook aangewend worden om op een kostprijsvriendelijke manier grote bevolkingsgroepen te screenen. Deze technieken werden onder meer aangewend voor het aantonen van DNA-adducten van benzo[a]pyrenen (Chen et al., 1996). Er dient echter voldoende

referentieadduct voorhanden te zijn om antilichamen specifiek voor de adduct te kunnen aanmaken, hierdoor is men beperkt tot de detectie van gekende adducten. Verder geeft deze techniek geen structurele informatie en bestaat er het gevaar voor kruisreactie met adducten van gelijkaardige chemische aard, wat aanleiding geeft tot een gebrek aan specificiteit.

II.1.1.3. GC-gebaseerde technieken

Gaschromatografische technieken gekoppeld aan massaspectrometrische detectie behoren eveneens tot de gevoeligste detectietechnieken die beschikbaar zijn. Eén groot nadeel voor het onderzoek naar DNA-adducten is dat de gemodificeerde basen, nucleosiden en zeker nucleotiden niet voldoende vluchtig zijn voor een GC-scheiding. Het is nodig ze te derivatiseren om een betere vluchtigheid en thermostabiliteit van de componenten te bekomen (Wellemans et al., 1994). Deze derivatisatie maakt de methode voor toepassing op het vlak van DNA-adduct analysecomplex, waardoor het gebruik beperkt is gebleven (Farmer, 1994). Tijdens derivatisatie kunnen daarenboven bepaalde adducten verloren gaan en kunnen artefacten gevormd worden (door degradatie van de oorspronkelijk gevormde adducten). Daardoor is deze techniek niet de eerstekeuzemethode in het onderzoek naar de opheldering van het reactiemechanisme van genotoxische producten en voor het onderzoek naar niet-gekende adducten. Wel is hij bruikbaar voor zeer gevoelige confirmatie en kwantificatie van gekende adducten.

II.1.1.4. HPLC-gebaseerde technieken

HPLC is de analyse techniek die, in de recente literatuur, het meest aangewend wordt in het onderzoek naar DNA-adducten. Dankzij koppeling (*on line* of *off line*) met instrumenten die structuurinformatie verschaffen (MS, MS/MS, IR of NMR), kunnen deze gecombineerde technieken gebruikt worden om de reactiemechanismen van DNA-adductvorming op te helderen. Als voorbeeld voor het onderzoek naar DNA-adduct vorming werden de glycidylethers gekozen (zie tabel 2.1).

De hier vermelde studies hebben alle als doel de gevormde adducten te identificeren en zodoende het reactiemechanisme van de adductvorming beter te begrijpen. Alle studies zijn dan ook gebaseerd op *in-vitro* proeven. Gezien de lagere gevoeligheid in vergelijking met de ^{32}P -postlabelingtechniek waren ze minder geschikt voor het *in-vivo* onderzoek naar blootstelling aan genotoxische carcinogenen. Recente studies maken echter gebruik van kolom-switching, nanoflow ES LC/MS en SIM detectie en bereiken nu een detectielimiet van 120 amol (Vanhoutte et al., 1997). Dat betekent dat theoretisch één adduct kan aangetoond worden op 10^{10} ongemodificeerde nucleotiden. Hiermee wordt de gevoeligheid van de ^{32}P -postlabelingtechniek geëvenaard en is dus de weg geopend naar *in-vivo* onderzoek.

TABEL 2.1: Literatuuroverzicht van DNA-adduct onderzoek voor glycidylethers door middel van HPLC-gebaseerde technologie.

studie uitgevoerd op	adduct vormer	gebruikte kolom	detector	referentie
nucleobasen	AGE	RPSelect B C18	UV (on-line) FAB-MS (off-line) ^1H NMR (off-line) ^{13}C NMR (off-line)	Plna et al., 1996
deoxynucleosiden	PGE	a)10-RP-18	DAD	Van den Eeckhout et al., 1991
		b)polystyreen-divinylb enzeen	FAB-MS (off-line) ^1H NMR (off-line)	
		10-RP Select B	TSP-MS (on-line)	Lemière et al., 1993
		5-RP-Select B	ES-MS (on-line) ^1H NMR (off-line) ^{13}C NMR (off-line)	Lemière et al., 1996
	BPADGE	5-RP-Select B	TSP-MS (on-line)	Vanhoutte et al., 1995
deoxynucleotiden	AGE	RPSelect B C18	UV (on-line) FAB-MS (off-line) ^1H NMR (off-line)	Plna et al., 1996

¹³ C NMR (off-line)				
	PGE	5-RP-Select B	ES-MS (on-line)	Vanhoutte et al., 1996
		NAN75-15-05-C8	ES-MS (on-line)	Vanhoutte et al., 1997

II.1.2. Overzicht van de bestaande CZE-methodologieën

Bij de aanvang van deze doctoraatsthesis stond het DNA-adduct onderzoek met behulp van CZE nog in zijn kinderschoenen, getuige daarvan is dat de literatuur over dit onderwerp op dat ogenblik, 1994, beperkt was tot één artikel (Norwood et al., 1993). Dit werk beschrijft het onderzoek naar de DNA-adductvorming van verschillende diolepoxiden van PAH's. Meteen werd ook duidelijk dat het grote probleem de gevoeligheid was van de CZE-analyse. Dit is te wijten aan het feit dat slechts een beperkt volume staaloplossing op het capillair kan geïnjecteerd worden (slechts 1 à 2% van de totale capillairlengte) (Edmonds et al., 1989; Chien en Burgi, 1992). Teneinde grotere staalvolumina te kunnen injecteren op het capillair en zodoende de gevoeligheid van de CZE-analyse op te drijven werden een aantal technieken ontwikkeld. Deze technieken zijn in te delen in twee grote groepen.

Eenzijds zijn er de concentratietechnieken die gebaseerd zijn op capillaire isotachoforese (CITP) (Udseth et al., 1989). De CITP-techniek, die op zich geen CZE-analyse is, wordt meer in detail besproken in Hoofdstuk III. Het concentratievermogen van CITP werd benut om stalen op het capillair te concentreren vooraleer over te gaan tot CZE-analyse. Bij deze combinatie van beide technieken wordt eerst CITP uitgevoerd gevolgd door CZE-scheiding. Er bestaan vele varianten op deze techniek die gedetailleerder besproken wordt in Hoofdstuk III (Hirokawa et al., 1993; Beckers, 1993; Krivankova et al., 1993; Kaniansky et al., 1993; Reinhoud et al., 1993; Thompon et al., 1993). Deze combinatie laat injectie van veel grotere volumina toe waardoor de gevoeligheid met een factor 100 verbeterd kan worden in vergelijking met conventionele CZE. Een nadeel van deze

technieken is de noodzaak aan een “leading” elektrolyt, met een hogere mobiliteit dan de staalcomponenten, en een “terminating” elektrolyt, met een lagere mobiliteit dan de staalcomponenten. Het vinden van geschikte “leading” en “terminating” elektrolyten is niet altijd eenvoudig en bovendien zijn deze meestal niet vluchtig wat problemen kan opleveren bij koppeling aan ES-MS.

Anderzijds werd de “sample stacking”-techniek ontwikkeld (Chien en Burgi, 1992; Burgi en Chien, 1992; Beckers en Ackermans, 1993; Norwood et al., 1993). In deze opstelling wordt het capillair initieel gevuld met de elektroforese buffer daarna wordt de staaloplossing geïnjecteerd waarbij het mogelijk is nagenoeg het ganse capillair te vullen met staal. De enige voorwaarde is dat het staal opgelost is in een extreem verdund buffersysteem, of in het ideale geval in water. Na deze injectie wordt een hoge spanning aangelegd over het capillair met een omgekeerde polariteit waardoor de negatieve staalcomponenten geconcentreerd worden in een smalle zone en de staaloplossing met lage elektrolytconcentratie volledig verwijderd wordt. Na uitvoering van deze “sample stacking”-techniek, die in dit hoofdstuk uitvoerig besproken zal worden, kan de conventionele elektroforese uitgevoerd worden zonder verlies van resolutie of scheidingsefficiëntie. De concentratiefactor van deze techniek is evenredig met die van de gecombineerde CITP-CZE-methoden (Chien en Burgi, 1992).

Naast deze concentreringstechnieken kan de gevoeligheid ook verhoogd worden door gebruik te maken van een detector met een hogere gevoeligheid dan een conventionele UV-detector. In dit opzicht is het interessant te vermelden dat Sharma et al. (1995) voor de detectie van de DNA-adducten van cisplatina en carboplatina een laserfluorescentie-detector (LIF) ontwikkelden in combinatie met CZE.

II.2. Inleiding

Het doel van dit onderdeel van het onderzoek was na te gaan of CZE een efficiënte methode was voor de analyse van DNA-adducten. Hier werden de kritische parameters van de op punt te stellen CZE-analyse bepaald en geoptimaliseerd. Dit onderzoek werd uitgevoerd in de optiek dat de op punt gestelde CZE-analyse methode compatibel moest zijn met een latere *on-line* koppeling met

massaspectrometrische detectie via een elektropray ionisatie-interface.

CZE werd gekozen als analysemethode gezien een aantal eigenschappen van CZE de techniek bijzonder aantrekkelijk maken voor toepassing op het vlak van DNA-adductanalyse. CZE is in de eerste plaats bijzonder geschikt voor de analyse van ionaire en polaire componenten (Wolf en Vouros, 1995) en gezien het de doelstelling was van dit onderzoek om DNA-hydrolysaten te bestuderen en 5'-monofosfaatnucleotiden, die door de aanwezigheid van de fosfaatgroep alle een sterk ionair karakter vertonen, was CZE een voor de hand liggende keuze. Bovendien zijn voor CZE-analyse slechts kleine hoeveelheden staal vereist (zoals verder zal blijken uit dit hoofdstuk wordt bij normale injectie zo'n 20 nl geïnjecteerd en bedraagt de detectielimiet 640 fmol), wat een belangrijke troef is voor het DNA-adductonderzoek (Chien en Burgi, 1992). CZE biedt ook een extreem hoge scheidingsefficiëntie (met een aantal theoretische platen (N) groter dan 500000) (Kuhr en Monning, 1992).

Teneinde voldoende staal te kunnen injecteren werd een "sample stacking"-techniek op punt gesteld en werden de kritische parameters geëvalueerd met het oog op een latere *on-line* koppeling met ES-MS.

II.3. Materiaal en methoden

II.3.1. Chemicaliën

2'-Deoxycytidine-5'-monofosfaat

(dCMP)

en

2'-deoxyadenosine-5'-monofosfaat (dAMP) waren van Janssen Chimica (Beerse). Thymidine-5'-monofosfaat (TMP), 2'-deoxyguanosine-5'-monofosfaat (dGMP), DNA type I van kalfthymus, deoxyribonuclease I (DNAaseI, EC. 3.1.21.1) en nuclease P₁ (EC. 3.1.30.1) waren van Sigma (St. Louis, MO, VS). (±)-2,3-epoxypropylfenylether (PGE) was van Aldrich (Steinheim, Duitsland). Chromabond HR-P ("Solid-Phase-Extraction") SPE-kolommen (500 mg bedvolume) waren van Machery-Nagel (Düren, Duitsland). Het water was van HPLC-kwaliteit en werd bekomen door zuivering van gedesoniseerd water met het Milli-Q Reagent Grade waterzuiveringssysteem (Millipore, Bedford, MA, VS). Het water gezuiverd met dit systeem voldeed ruim aan alle ISO3696/BS3978 standaarden voor graad-I-zuiverheid en bezat een weerstand van 18.2 MΩ.cm. Alle chemicaliën gebruikt voor de bereiding van de elektroforesebuffers waren van *pro analysi* kwaliteit.

II.3.2. Adductbereiding

Om microbiële contaminatie te vermijden werden alle manipulaties uitgevoerd in een LAF-kast. Het HPLC-water, alle glaswerk, plastic- en andere recipiënten werden voor gebruik geautoclaveerd. Alle buffers en niet-autoclaveerbare oplossingen werden onderworpen aan filtersterilisatie (0.22 µm poriën steriele celluloseacetaat-spuutfilters van Roth, Karlsruhe, Duitsland).

5'-Monofosfaatnucleotideadducten werden bereid als referentiecomponenten om een CZE- scheidingsmethode te optimaliseren en de parameters kritisch voor de op punt gestelde scheidingsmethode te evalueren. De 5'-monofosfaatnucleotiden werden opgelost in HPLC-water aan een concentratie van 2 mg/ml en werden onderworpen aan filtersterilisatie. Aan 1 ml aliquots werd 2 ml van een vers bereide 0.5 M methanolische oplossing van PGE toegevoegd. De stalen werden 24 uur geïncubeerd in gesloten reageerbuizen in een incubatoroven op 37°C onder licht schudden. De reacties werden gestopt door de methanol in te dampen onder een stroom stikstofgas, waarbij het resterende PGE neerslaat. Aan de overblijvende vloeistof werd 1 ml HPLC-water toegevoegd en na goed mengen werd dit mengsel

drie keer geëxtraheerd met 3 ml chloroform ten einde alle niet-gereageerde PGE te verwijderen, vervolgens werd de waterfase gelyofiliseerd en gereconstitueerd in 6 ml HPLC-water.

Het kalfthymus-DNA werd opgelost in HPLC-water aan een concentratie van 10 mg/ml. Aan 1 ml aliquots werd 2 ml van een vers bereide 0.5 M methanolische oplossing van PGE toegevoegd. De stalen werden 48 uur geïncubeerd in gesloten reageerbuizen in een incubatoroven op 37°C onder licht schudden. De reacties werden gestopt door de methanol in te dampen onder een stroom stikstofgas, waarbij het resterende PGE neerslaat. Aan de overblijvende vloeistof werd 1 ml HPLC-water toegevoegd en na goed mengen werd dit mengsel drie keer geëxtraheerd met 3 ml chloroform. De waterfase werd verdeeld over vier recipiënten, die vervolgens onderworpen werden aan een DNA-precipitatie door toevoegen van natriumacetaat (tot een eindconcentratie van 0.3 M) en ethanol (tot een eindconcentratie van 70 %). Na 1 uur incubatie bij -20°C werd het geprecipiteerde DNA afgecentrifugeerd (15 minuten bij 12.000 g in een gekoelde centrifuge (4°C)). De DNA-pellet werd dan opgelost in 1 ml van de hydrolysebuffer (20 mM Tris/HCl, 50 μ M CaCl₂ en 2.25 mM MgCl₂, pH 7.5) en na toevoegen van 500 U DNAase I werd dit mengsel gedurende 12 uur geïncubeerd bij 37°C. Vervolgens werden 20 μ l van een 1M natriumacetaat oplossing (pH 5.2) en 5 U nuclease P₁ toegevoegd en werd de incubatie gedurende 6 uur verder gezet bij 37°C. Aldus werden 5'-monofosfaatnucleotiden en hun adducten bekomen.

II.3.3. Capillaire zone elektroforesetoestel

CZE-scheidingen werden uitgevoerd op een Lauerlabs PRINCE systeem (Lauerlabs, Emmen, Nederland) met autosampler, uitgerust met de softwareversie 4.201. Dit systeem beschikt over een dynamisch compressie-injectiesysteem, waarbij de injectiedruk (in een range van -150 tot 250 mbar) gecontroleerd wordt op basis van de wet van Boyle. Gezien deze niet bepaald wordt met een drukgevoelige sensor, kan de druk met een hoge precisie, accuraatheid (+/- 1 %, waarde opgegeven door fabrikant) en reproduceerbaarheid (0.1 % relatieve

standaarddeviatie, waarde opgegeven door fabrikant) ingesteld en bepaald worden. De hogere drukken, gebruikt voor spoelen van het capillair, (in een range van 250-2500 mbar) worden wel gecontroleerd door een drukgevoelige sensor, waardoor de reproduceerbaarheid iets lager ligt (1.0 % relatieve standaarddeviatie, waarde opgegeven door fabrikant). De hoogspanningsbron kan een spanningsrange van -30 kV tot +30 kV leveren met een maximale stroom van 200 μ A. Het aanbrengen van zowel druk als spanning over het capillair gebeurt geleidelijk en dit onder gecontroleerde omstandigheden wat aanleiding geeft tot een betere reproduceerbaarheid van de ingestelde waarden (De relatieve standaarddeviatie op het injectievolume is kleiner dan 1.0 %, waarde opgegeven door de fabrikant). De autosampler is gethermostatiseerd en kan ingesteld worden op een temperatuur tussen 4° en 40°C (met een stabiliteit van $\pm 1^\circ\text{C}$ en een accuraatheid van $\pm 0.5^\circ\text{C}$, waarden opgegeven door de fabrikant). Het capillair is eveneens gethermostatiseerd door een actieve luchtstroom langsheen het capillair. De temperatuur kan ingesteld worden tussen 10°C boven de kamertemperatuur en 60°C met een stabiliteit van $\pm 0.1^\circ\text{C}$ en een accuraatheid van $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Het thermostatiseren van het capillair is extreem belangrijk om de vorming van temperatuursgradiënten in het capillair ten gevolge van Joule-verhitting tegen te gaan. Deze temperatuursgradiënten veroorzaken verschillen in viscositeit van de buffer die aanleiding geven tot piekverbreeding met als gevolg verlies van resolutie en efficiëntie van de scheiding (Heiger, 1992).

Detectie werd uitgevoerd bij een golflengte van 270 nm met een Kontron UV-detector (Kontron Instruments, Milaan, Italië), type HPLC 332, uitgerust met een flowcellhouder voor rechtstreekse detectie op het capillair. Daartoe werd de poly-imide coating van het capillair verwijderd over een zone van 1 cm om een detectievenster te creëren.

Datacollectie werd uitgevoerd op een PC met het softwarepakket "PC Integration Pack" versie 3.90 (Kontron Instruments, Milaan, Italië).

II.3.4. Bufferbereiding

De ammoniumcarbonaatbuffers en ammoniumacetaatbuffers werden bereid door het overeenstemmende zout op te lossen in geautoclaveerd HPLC-water in de aangegeven molariteiten (tussen 12.5 mM en 200 mM). Na oplossen van het zout werd de buffer ingesteld op de gewenste pH (tussen 9.38 en 10.20) door toevoegen van ammoniumhydroxyde. De pH werd bepaald met behulp van een pH-meter met glaselektrode (HI9024, Hanna Instruments, Richmond, VS). Deze pH meter werd voor elk gebruik gekalibreerd ten opzichte van de referentiebuffer-standaarden met pH 4.01 (Hanna Instruments, gefabriceerd onder ISO 9002 norm traceerbaar naar de NIST 185g SRM standaard) en pH 7.01 (Hanna Instruments, gefabriceerd onder ISO 9002 norm traceerbaar naar de NIST 186-I-e standaard).

Alle buffers werden eveneens onderworpen aan filtersterilisatie (0.22 μ m-poriën steriele celluloseacetaat-spuifilters van Roth, Karlsruhe, Duitsland), met als tweeledig doel: het verwijderen van stofdeeltjes die obstructie van het capillair zouden kunnen veroorzaken en het voorkomen van microbiële groei in de buffer die eveneens zou kunnen leiden tot obstructie. Vóór gebruik werd de buffer in de buffervials gedurende 5 minuten ondergedompeld in een ultrasone bad (Transsonic 460, Elma, Duitsland) teneinde luchtocclusies te verwijderen. Deze kunnen tijdens de elektroforese coalesceren en verantwoordelijk zijn voor stroomonderbreking.

II.3.5. Capillaire zone elektroforese

Het capillair was een “fused silica”-capillair met een i.d. van 75 μ m en een totale lengte van 92.5 cm. De afstand tussen het injectie-uiteinde en de UV-detector bedroeg 61.5 cm. Aan beide uiteinden werd de poly-imide coating verwijderd, dit was nodig omdat de ammonium buffers de coating losweken van het capillair met als gevolg dat stroomfluctuaties ontstaan doordat de buffer die zich tussen het capillair en de losgekomen coating bevindt begint te koken. Dit geeft aanleiding tot spikes in het elektroferogram.

De autosampler, met stalen en buffers, werd gethermostatiseerd op 5°C, dit om degradatie van de stalen tegen te gaan en om vervluchtiging van buffercomponenten te voorkomen. Dit laatste punt is heel belangrijk gezien hier

vluchtige (ammoniumcarbonaat en ammoniumacetaat) buffers worden gebruikt. Verdamping kan dan ook verantwoordelijk zijn voor een wijziging van de buffersamenstelling die op zijn beurt een grote invloed heeft op de reproduceerbaarheid van de resultaten. Het capillair werd op een temperatuur van 30°C gehouden.

Aan de uitlaatzijde bevindt het capillair zich in een buffervaatje, het vloeistof niveau in dit vaatje dient zich op dezelfde hoogte te bevinden als het vloeistofniveau in de buffervaatjes aan de inlaatzijde. Dit is belangrijk om heveffecten te vermijden, die de resolutie en de efficiëntie van de scheiding negatief beïnvloeden.

Een nieuw capillair werd gepreconditioneerd door het achtereenvolgens te spoelen met 0.1 M NaOH (1000 mbar, 1 uur), HPLC-water (1000 mbar, 15 minuten) en de elektroforese-buffer (1000 mbar, 30 minuten). Deze procedure is nodig om de -OH-groepen van de silicawand vrij te maken (Smith et al. 1991). Tussen elke analyse werd het capillair achtereenvolgens gespoeld met elektroforesebuffer (1000 mbar, 2 minuten), HPLC-water (1000 mbar, 2 minuten) en opnieuw elektroforesebuffer (1000 mbar, 2 minuten).

Normale injectie gebeurde door het capillair onder te dompelen in de staaloplossing en een druk aan te brengen van 22 mbar gedurende 12 seconden. De elektroforese werd uitgevoerd door een spanningsverschil van 17 kV aan te leggen over het capillair.

II.3.6. Ontwikkeling van een "sample stacking"-systeem

Veelal worden de stalen voor de analyse gebruik makende van CZE opgelost in hetzelfde buffersysteem als het buffersysteem dat gebruikt wordt voor de elektroforese. Daarbij wordt ervoor gezorgd dat de concentratie aan elektrolyt van beide gelijk is, dit om elektrodispersie-effecten tegen te gaan waardoor niet-Gaussiaanse piekvormen kunnen ontstaan. Wanneer echter het staal opgelost is in een buffer van gelijke elektrolytconcentratie als de elektroforesebuffer dan is het belangrijk dat de geïnjecteerde plug-lengte niet meer bedraagt dan 2% van de totale capillairlengte. Injectie van een grotere staalplug geeft in dat geval aanleiding

tot een scherpe daling van de scheidingsefficiëntie en de resolutie van het systeem (Chien en Burgi, 1992; Burgi en Chien, 1992; Beckers en Ackermans, 1993b).

Dezelfde auteurs bespreken de mogelijkheid van het injecteren van een staal dat in het extreme geval opgelost is in water (als extreem verdunde buffer). Onder die omstandigheden worden de geladen componenten aanwezig in het staal geconcentreerd aan de staal-buffer interface. Dit geeft aanleiding tot een concentratie-effect van de componenten in het staal. Onder die omstandigheden dient echter de lengte van de staalplug die geïnjecteerd wordt eveneens onder de 2% van de totale capillairlengte te blijven, wat geen winst zou geven in gevoeligheid ten opzichte van het eerst beschreven systeem. Echter door het aanleggen van een hoge spanning met een omgekeerde polariteit na de injectie, worden de negatieve staalcomponenten geconcentreerd in een smalle zone waarbij de staalbuffer volledig verwijderd wordt. Deze techniek laat toe dat, in het extreme geval, het capillair volledig met staal gevuld kan worden. Na deze concentratiestap kan de conventionele elektroforese uitgevoerd worden zonder verlies van resolutie of scheidingsefficiëntie. Deze techniek laat toe de ionaire staalcomponenten tot een factor honderd te concentreren op het capillair.

Gezien de moleculen die ons interesseren alle negatief geladen zijn (5'-monofosfaat-nucleotiden en hun adducten) werd deze techniek geoptimaliseerd voor dit doeleinde. Daartoe werd het capillair initieel gevuld met de ammoniumcarbonaatbuffer (100 mM, pH 9.68), en de geleiding werd bepaald door de stroom te meten die gegenereerd werd bij het aanleggen van een spanning van -7 kV. Deze stroom bedroeg zo'n -45 tot -52 μA en werd de stack-limietstroom geheten. Vervolgens werd een staalplug van de gewenste lengte hydrodynamisch geïnjecteerd, die geconcentreerd werd door het aanleggen van -7kV. Dit elektrisch veld veroorzaakt een elektro-osmotische flow die de staalplug uit het capillair verwijderd (naar de negatieve elektrode toe, zijnde de injectiezijde van het capillair), en gelijktijdig de negatieve moleculen concentreert aan de interface tussen de buffer en de staalplug. Tijdens dit proces werd de stroom gevolgd (initieel -15 μA), wanneer deze de stack-limietstroom vermeerderd met 0.5 μA (betekenend dat de staalplug

bijna volledig is verwijderd) bereikte werd de nastacking gestart. Deze nastacking, -5 kV gedurende 30 seconden, was nodig om de staalplug volledig van het capillair te verwijderen. Daarna werd de conventionele elektroforese gestart.

II.3.7. Opzuivering op HR-P kolommen

De analyse van de DNA-hydrolysaten werd omwille van twee redenen bemoeilijkt. Een eerste probleem was de aanwezigheid van een hoge elektrolytconcentratie in het DNA-hydrolysaat (± 50 mM) waardoor de “sample stacking” belemmerd werd. Een tweede probleem was de aanwezigheid van een grote hoeveelheid ongemodificeerde nucleotiden in het DNA-hydrolysaat, wat aanleiding gaf tot overladen van het capillair.

Daarom werd geopteerd voor een voorafgaandelijke opzuivering, die zowel de zouten als de ongemodificeerde nucleotiden uit het DNA-hydrolysaat kon verwijderen en waarbij de adducten geconcentreerd werden. Deze opzuivering is gebaseerd op de aanwezigheid van een fenolisch residu in de PGE-molecule en dus ook in de desbetreffende adducten. Dit fenolisch residu wordt dankzij Van der Waals-interactie vastgehouden op het polystyreen-di-vinylbenzeen copolymeer van de Chromabond HR-P[®] SPE-extractiekolommen.

De vaste fase van de SPE-kolommen werd gereduceerd tot 125 mg. Vervolgens werden de kolommetjes geconditioneerd door ze achtereenvolgens te spoelen met 3 ml methanol, 3 ml 50/50 methanol/HPLC-water en 9 ml HPLC-water. Een aliquot van 200 μ l van het DNA-hydrolysaat werd op de kolom aangebracht en werd gespoeld met 6 keer 1 ml HPLC-water (dit zijn fracties 1 tot en met 6 in tabel 2.4 (zie II.4.6)). Deze fracties werden gecollecteerd in hoeveelheden van 1 ml in afzonderlijke Eppendorf[®] cupjes. Vervolgens werden de nucleotideadducten geëlueerd met achtereenvolgens 2 keer 1 ml 50/50 methanol/HPLC-water (fracties 7 en 8 in tabel 2.4 (zie II.4.6)) en 5 keer 1 ml methanol (fracties 9 tot en met 13 in tabel 2.4 (zie II.4.6)), de eluaten werden gecollecteerd in afzonderlijke Eppendorf[®] cupjes. De methanol werd uit de diverse fracties verwijderd door indamping onder een stroom stikstofgas. Het residu werd opgelost in 1 ml HPLC-water en

geanalyseerd met de op punt gestelde CZE-methode.

II.4. Resultaten en bespreking

II.4.1. Keuze van het buffersysteem

Aangezien het de bedoeling was om de te ontwikkelen CZE-scheidingsmethode uiteindelijk *on line* te koppelen met elektropray-massaspectrometrie (ES-MS), was de keuze van het buffersysteem beperkt tot vluchtige buffersystemen. Het gebruik van niet-vluchtige zouten in een buffersysteem geeft aanleiding tot sedimentvorming in de ES-bron wat leidt tot een progressieve daling van de gevoeligheid van het systeem.

In de literatuur (Norwood et al., 1993; Wolf et al., 1992) werden buffersystemen van pH-waarden in het gebied van pH 9 tot pH 10 aangewend voor de analyse van nucleotiden met CZE. Daar een CZE-buffer bij voorkeur een pH-waarde dient te bezitten die één pH-eenheid boven of onder zijn pK_a waarde ligt, werden de volgende vluchtige buffersystemen geselecteerd voor verdere evaluatie (tabel 2.2):

TABEL 2.2: Buffersystemen uitgetest voor CZE-analyse van nucleotide-PGE-adducten.

zout	mogelijke reacties	pK_a waarde	bruikbaar pH gebied
$(NH_4)_2CO_3$	$H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$	6,4	5,4 tot 7,4
	$NH_4^+ \rightleftharpoons NH_3 + H^+$	9,2	8,2 tot 10,2
	$HCO_3^- \rightleftharpoons CO_3^{2-} + H^+$	10,4	9,4 tot 11,4
NH_4OOCCH_3	$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$	4,75	3,75 tot 5,75
	H^+	9,2	8,2 tot 10,2
	$NH_4^+ \rightleftharpoons NH_3 + H^+$		

II.4.2. Evaluatie van de invloed van de bufferconcentratie

De verschillende parameters die van belang zijn bij de optimalisatie en de evaluatie van een bepaalde CZE-scheiding zijn: migratietijd en mobiliteit, efficiëntie en resolutie. De invloed van de gebruikte bufferconcentratie op deze parameters werd nagegaan voor de geselecteerde buffersystemen.

II.4.2.1. Invloed op de migratietijd en de mobiliteit

Wanneer de migratietijden (t_m) voor een aantal geselecteerde pieken uit het elektroferogram uitgezet worden in verhouding tot de vierkantswortel van de bufferconcentratie (C in mM) dan wordt een lineair verband waargenomen (zie figuur 2.1). In figuur 2.1, 2.2 en 2.3 zijn de resultaten weergegeven voor de analyses van het mengsel van de reactieproducten van de vier nucleotiden met PGE. Deze analyses werden uitgevoerd met de ammoniumcarbonaatbuffer bij een pH van 9.68 en bij een spanning van 17 kV. Zoals blijkt uit figuur 2.1 nemen de migratietijden toe met stijgende bufferconcentratie. In alle analyses kon de elektro-osmotische-flow (EOF) gevolgd worden door de aanwezigheid van PGE-diol in de stalen wat gezien zijn neutraal karakter migreert samen met de EOF.

Eenzelfde lineair verband wordt bekomen met het ammoniumacetaat-buffersysteem. Dit lineair verband werd eveneens beschreven door Issaq et al. (1991) voor de analyse van dansyl- aminozuren in een fosfaat- en acetaatbuffer.

Uit deze migratietijden (t_m in sec), die rechtstreeks kunnen worden afgelezen op het elektroferogram, kan de netto mobiliteit (μ_n in cm^2/Vsec) afgeleid worden, door middel van formule (1):

(1)Fout!

Waarin l (cm) de capillairlengte voorstelt van injectie tot detectie, v (cm/sec) de migratiesnelheid van de component en E (V/cm) de elektrische veldsterkte. De elektrische veldsterkte is de verhouding van de aangelegde spanning (V in Volt) tot de totale capillair lengte (L in cm). Deze netto mobiliteit is de som van de elektro-osmotische mobiliteit μ_{eo} en de elektroforetische mobiliteit μ_{ef} . Aangezien de μ_{ef} voor een neutrale component (zoals PGE-diol) nul is kan μ_{eo} rechtstreeks afgeleid worden uit de t_m van de PGE-diol piek. Eénmaal de μ_{eo} bekend is kan voor die analyse de μ_{ef} ($= \mu_n - \mu_{eo}$) van ieder ion berekend worden.

Zoals blijkt uit figuur 2.2 daalt de elektro-osmotische mobiliteit bij een stijging van de bufferconcentratie, wat ten gevolge van het verband beschreven in formule (1) aanleiding geeft tot een stijging van de t_m . Een verklaring voor deze waarneming werd gegeven door Issaq et al. (1991) (zie formule (2)). Daarin stelt D de

diëlektrische constante voor, ζ_{eo} de zeta-potentiaal ter hoogte van de capillairwand en η de viscositeit van het buffersysteem.

(2)Fout!

Waaruit blijkt dat μ_{eo} evenredig is met de zeta-potentiaal ter hoogte van de capillairwand, die op zijn beurt proportioneel is met de dikte van de diffusie-dubbellaag aan de capillairwand (gegeven door δ , zijnde de Debye-radius). De dikte van de diffuse-dubbellaag wordt op zijn beurt bepaald door de bufferconcentratie zoals weergegeven in formules (3) en (4) (Tsuda et al., 1982).

(3)Fout!

(4)Fout!

De lading per oppervlakte-eenheid wordt voorgesteld door e en Z geeft het aantal valentie-elektronen aan.

Aangezien ζ_{eo} daalt bij een stijging van de bufferconcentratie, daar een verhoogde ionenconcentratie aanleiding geeft tot een compressie van de elektrische dubbellaag aan de capillairwand, zal de elektro-osmotische mobiliteit dalen bij stijgende bufferconcentraties. Figuur 2.3 laat vermoeden dat de invloed van de bufferconcentratie op de elektroforetische mobiliteit gering is. De elektroforetische mobiliteit van een component wordt bepaald door formule (5) (Rasmussen en McNair, 1990):

(5)Fout!

waarin z de lading van het deeltje voorstelt, q de lading van een elektron en r de hydrodynamische radius van de component. De enige factor in deze formule die beïnvloed kan worden door de bufferconcentratie is de hydrodynamische radius van het deeltje.

Zoals blijkt uit onze resultaten en die van Rasmussen en McNair (1990) is de eventuele invloed op de hydrodynamische radius van de bufferconcentratie gering tot verwaarloosbaar. We kunnen dan ook besluiten dat de elektroforetische mobiliteit nagenoeg niet beïnvloed wordt door de bufferconcentratie.

II.4.2.2. Invloed op de efficiëntie

De efficiëntie van een scheiding wordt bepaald door het aantal theoretische platen (N), die rechtstreeks kunnen afgeleid worden uit een elektroferogram gebruik makende van formule (6):

(6) **Fout!**

Waarbij w_b de piekbreedte voorstelt bij de basislijn (in sec). In figuur 2.4 werd N uitgezet in functie van de vierkantswortel van de concentratie. De weergegeven waarde voor N bij elke concentratie is de gemiddelde waarde van N voor de pieken, bij die concentratie, van het basegealkyleerde dAMP, het basegealkyleerde dCMP, het basegealkyleerde dGMP, dAMP en dCMP uit de analyse van het mengsel van de reactieproducten van PGE met de vier nucleotiden. Deze analyses werden uitgevoerd met de ammoniumcarbonaatbuffer bij een pH van 9.68 en bij een spanning van 17 kV.

Uit deze figuur blijkt dat de efficiëntie van de scheiding sterk toeneemt met een stijgende bufferconcentratie. Eenzelfde verband werd beschreven door Issaq et al. (1991) voor de analyse van dansylaminozuren in een fosfaat- en acetaatbuffer. Hun resultaten vertonen echter een daling van de efficiëntie na een initiële stijging wanneer de bufferconcentratie hoger dan 75 mM wordt. Het door ons gebruikte buffersysteem vertoonde geen dergelijke daling. Wel dient opgemerkt te worden dat bufferconcentraties hoger dan 100 mM aanleiding gaven tot vorming van gasbellen in het capillair als gevolg van een te sterke opwarming. Deze bevindingen zijn echter niet te verklaren door de formule (7) aangehaald door Issaq et al. (1991), waarbij zij verklaren dat gezien de nettomobiliteit daalt bij stijgende concentratie, het aantal theoretische platen stijgt bij stijgende concentratie! Merk op dat dit een grove vergissing is.

(7) **Fout!**

Hierin stelt Diff de diffusieconstante voor. Deze formule zou laten vermoeden dat N zou dalen bij stijgende bufferconcentratie aangezien de nettomobiliteit dan daalt. Dit is echter niet in overeenstemming met onze waarnemingen en ook niet met de waarnemingen van Issaq et al. (1991).

Dit afwijkend resultaat kan verklaard worden door het feit dat formule

(7), ervan uitgaat dat de enige factor die bijdraagt tot piekbreedte in CZE de longitudinale diffusie is. Dit is enkel juist onder ideale omstandigheden. Een correctere benadering wordt weergegeven door formules (8) en (9).

(8)Fout!

$$(9) \sigma_T^2 = \sigma_{DIF}^2 + \sigma_{INJ}^2 + \sigma_{TEMP}^2 + \sigma_{ADS}^2 + \sigma_{DET}^2 + \sigma_{Electrodispersie}^2 + \dots$$

In deze formules stelt σ_T^2 de totale standaardvariatie voor van de piek (in minuten), die dus de som is van de variaties veroorzaakt door diffusie (DIF), injectie (INJ), temperatuurgradiënten (TEMP), adsorptie aan de capillair wand (ADS), detectie (DET) en elektrodispersie. Als één van deze termen belangrijker wordt dan de diffusie-term dan is formule (7) niet langer geldig. In de hier voorgestelde situatie kan de sterke stijging van de efficiëntie bij stijgende bufferconcentratie verklaard worden door de belangrijke invloed van de variatie veroorzaakt door elektrodispersie.

De elektrodispersie van een component is belangrijk wanneer zijn concentratie relatief hoog is ten opzichte van de bufferconcentratie, in deze situatie heeft de component een belangrijke invloed op de elektrische geleiding van de zone waarin hij zich bevindt waardoor de geleiding in die zone sterk kan verschillen van de geleiding in de rest van het capillair, wat dan op zijn beurt aanleiding geeft tot piekverbreding van die component. Dit verband tussen de concentratie van een staalcomponent en het aantal theoretische platen bij een constante bufferconcentratie werd vastgesteld door Lukacs en Jorgenson (1985), die vaststelden dat een daling van de concentratie van de staalcomponent aanleiding geeft tot een sterke stijging van de efficiëntie van de scheiding.

Om dergelijke invloed uit te sluiten dient de bufferconcentratie idealiter 100 x hoger te zijn dan de concentratie van het staal. In acht nemend dat de staalconcentratie van de meest geconcentreerde componenten in onze analyses ongeveer 1 mM bedroeg verklaart dit inderdaad het verband dat bekomen werd tussen de bufferconcentratie en de efficiëntie van de scheiding.

II.4.2.3. Invloed op de resolutie

De resolutie (R) van de te scheiden componenten, die uiteindelijk de kwaliteit van een scheiding bepaalt, kan eveneens rechtstreeks afgeleid worden uit een elektroferogram gebruik makend van de formule (10):

(10) **Fout!**

De indexen 1 en 2 in deze formule refereren naar de respectieve parameters voor twee nabijgelegen pieken 1 en 2. In figuur 2.5 werd de resolutie voor 4 naburige pieken, uit de analyse van het mengsel van de reactieproducten van PGE met de vier nucleotiden, uitgezet in functie van de vierkantswortel van de concentratie. CZE-analyse werd uitgevoerd met de ammoniumcarbonaatbuffer bij een pH van 9.68 en bij een spanning van 17 kV.

Deze grafiek bevestigt wat reeds vermoed kon worden uit de verbanden van de retentietijden (zie figuur 2.1) en de efficiëntie (zie figuur 2.4), namelijk dat de resolutie van de scheiding sterk toeneemt bij stijgende bufferconcentratie.

II.4.2.4. Conclusies betreffende de invloed van de bufferconcentratie

Gezien de resolutie van de scheiding gevoelig toeneemt bij stijgende bufferconcentratie kan geopteerd worden voor het gebruik van de hoogst bruikbare bufferconcentratie van 100 mM. Zoals reeds vermeld, had het verder opdrijven van de bufferconcentratie, tot 150 mM, een hogere hitteproductie in het capillair voor gevolg zodat in het capillair gasbellen werden gevormd die het gebruik van een dergelijk buffersysteem onmogelijk maakten. Deze hoge bufferconcentratie (100 mM) gaf aanleiding tot iets verlengde migratietijden in vergelijking met lagere concentraties, doch de analyseduur bleef aanvaardbaar.

Alle bovenvermelde verbanden werden weergegeven als resultaten van de scheiding van het reactiemengsel van de reactieproducten van PGE met de vier nucleotiden in het ammoniumcarbonaat-buffersysteem bij een pH van 9.68. Ook bij de scheiding van hetzelfde mengsel in het ammoniumacetaat-buffersysteem bij pH

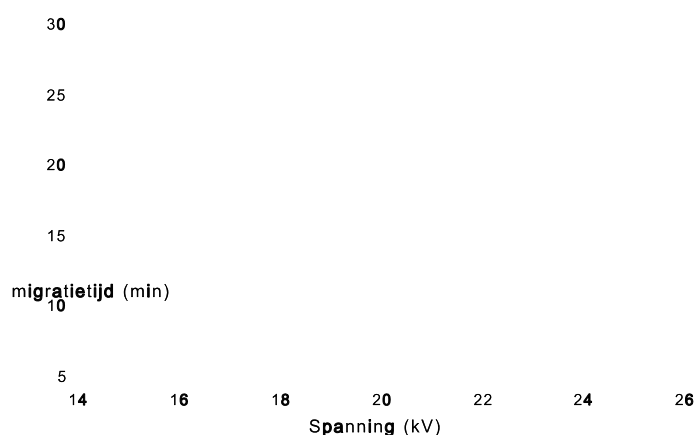
10.5 werden dezelfde verbanden waargenomen.

II.4.3. Evaluatie van de invloed van de aangelegde spanning

II.4.3.1. Invloed op de migratietijd en de mobiliteit

Wanneer de migratietijden voor een aantal geselecteerde pieken uitgezet worden tot de aangelegde spanning (V) wordt een lineair verband waargenomen. In figuur 2.6 zijn de resultaten weergegeven voor de analyse van de reactieproducten van de vier nucleotiden met PGE. Deze analyses werden uitgevoerd met het ammoniumcarbonaat-buffersysteem met een concentratie van 25 mM bij pH 10.5. Zoals blijkt uit deze grafiek nemen de migratietijden af bij het verhogen van de aangelegde spanning, dit lineair verband volgt uit formule (1).

(1) **Fout!**



Gebruik makend van dezelfde formule (1) kunnen de elektro-osmotische mobiliteit en de elektroforetische mobiliteiten berekend worden voor iedere analyse. Wanneer deze mobiliteiten uitgezet worden in functie van de aangelegde spanning wordt duidelijk dat de aangelegde spanning de μ_{eo} en de μ_{ef} niet beïnvloedt. Dit wordt eveneens weerspiegeld in de formules (2) en (5) waar geen van de termen verwijst

naar de aangelegde spanning. We kunnen dus stellen dat de aangelegde spanning geen invloed heeft op de elektro-osmotische noch op de elektroforetische mobiliteit.

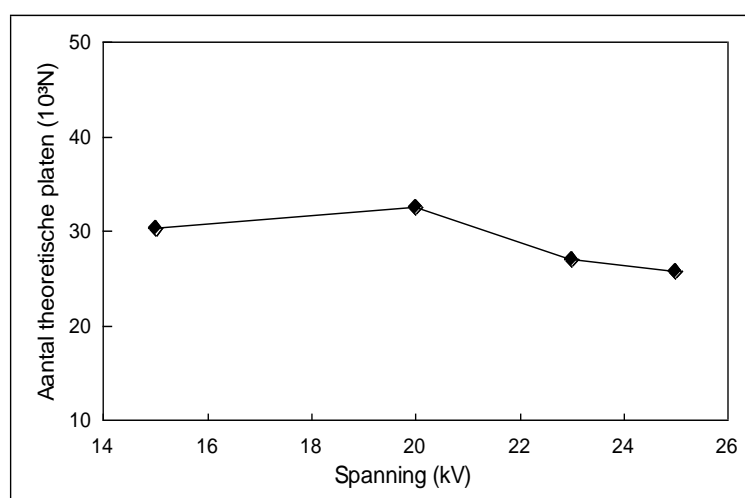
(2)**Fout!**

(5)**Fout!**

Er werd echter vastgesteld dat bij het aanleggen van een spanning van 23 kV of hoger, veel spikes in het elektroferogram verschenen. Dit zijn scherpe artefactpieken die waarschijnlijk veroorzaakt worden door elektrische vonkontladingen in de zones waar zich component bevindt. Zoals reeds eerder besproken heeft de aanwezigheid van een component een grote invloed op de lokale geleidbaarheid van de buffer. Deze spikes waren dan ook vooral aanwezig ter hoogte van de pieken in het elektroferogram.

II.4.3.2. Invloed op de efficiëntie

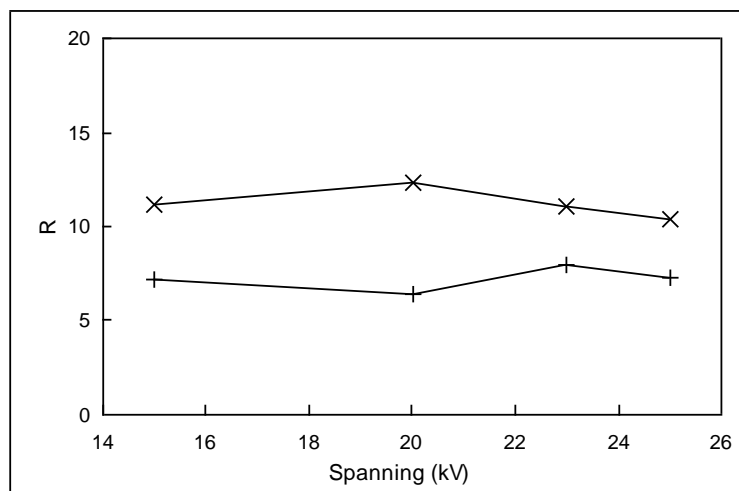
In figuur 2.7 wordt N uitgezet in functie van de aangelegde spanning. De weergegeven waarde voor N bij een bepaalde spanning is de gemiddelde waarde voor N van de pieken van het fosfaatgealkyleerde TMP, het basegealkyleerde dGMP en dCMP uit de analyse van het mengsel van de reactieproducten van PGE met de vier nucleotiden. Deze analyses werden uitgevoerd met het ammoniumcarbonaat-buffersysteem met een concentratie van 25 mM bij pH 10.5. Het is opmerkelijk dat een verhoging van de aangelegde spanning niet weerspiegeld wordt in een verhoging van het aantal theoretische platen. Eenzelfde observatie werd gepubliceerd door Issaq et al. (1991) voor de analyse van dansylaminozuren. Deze experimentele resultaten lijken op het eerste zicht contradictorisch met de formule (7) die laat vermoeden dat er een rechtevenredig verband bestaat tussen de aangelegde spanning en N . Zoals reeds vroeger werd aangehaald is het correcter formules (8) en (9) aan te wenden om een verklaring te vinden voor het verband tussen N en de analyseomstandigheden. De winst in efficiëntie van de scheiding die bekomen zou worden door het verhogen van de spanning wordt tenietgedaan door een stijging van de variatie veroorzaakt door de temperatuurgradiënt (σ^2_{TEMP}).



Bij het aanleggen van een hogere spanning vloeit er ook meer stroom door de buffer wat aanleiding geeft tot een toename van de Joule-verhitting. Deze verhitting is verantwoordelijk voor de toename van de temperatuurgradiënt. De temperatuurgradiënt is het temperatuurverschil dat ontstaat tussen het centrum van het capillair en de inwendige wand. Gezien een verschil van 1 °C aanleiding geeft tot een viscositeitsverschil van 2 à 3 %, resulteert een toename van de temperatuurgradiënt in een bandverbreding (Heiger, 1992). Dit verklaart waarom bij een verhoging van de aangelegde spanning er geen toename is in de efficiëntie van de scheiding.

II.4.3.3. Invloed op de resolutie

Wanneer de resolutie tussen drie naburige pieken, uit het elektroferogram van de analyse van het mengsel van de reactieproducten van PGE met de vier nucleotiden, uitgezet wordt in functie van de aangelegde spanning (figuur 2.8), dan valt op dat de aangelegde spanning eveneens geen noemenswaardige invloed heeft op de resolutie, die uiteindelijk de kwaliteit van een scheiding bepaalt. CZE-analyse werd uitgevoerd met de ammoniumcarbonaatbuffer (25 mM, pH 10.5).



II.4.3.4. Conclusies betreffende de invloed van de aangelegde spanning

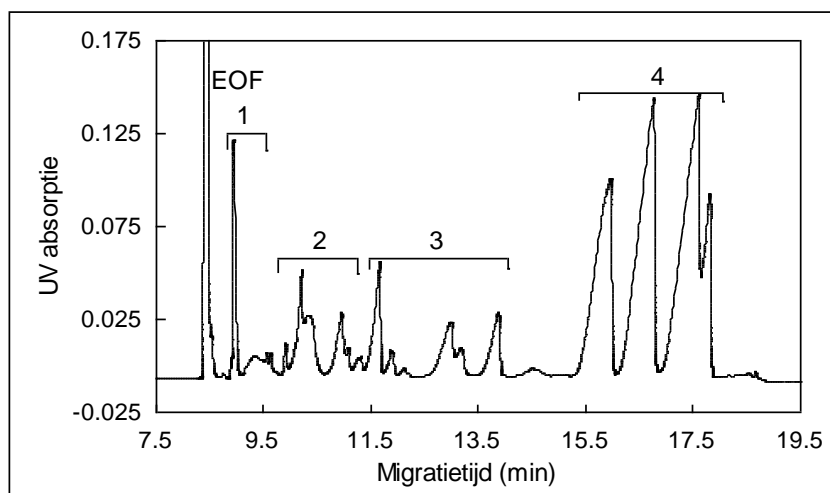
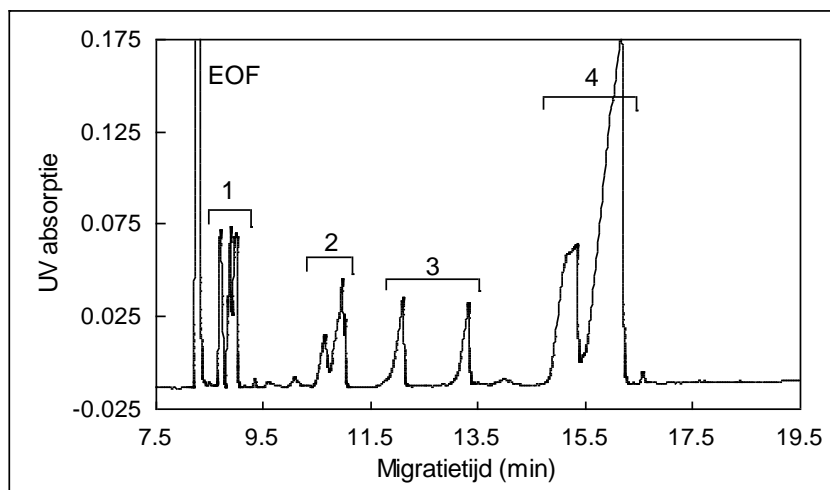
Concluderend kan gesteld worden dat de enige noemenswaardige invloed van het verhogen van de aangelegde spanning is, dat de analysetijden gevoelig korter worden. Een spanning van 23 kV of meer geeft echter aanleiding tot het verschijnen van storende spikes in het elektroferogram. Gezien deze hogere spanning geen aanleiding geeft tot een betere efficiëntie of resolutie werd geopteerd voor het gebruik van een spanning van 17 kV.

II.4.4. Evaluatie van de invloed van de buffer pH

De invloed van de pH van de buffer werd onderzocht gebruik makend van de 25 mM ammoniumcarbonaat-buffersystemen in een gebied tussen pH 9.38 en 10.20. De CZE-analyse werd uitgevoerd bij een spanning van 17 kV. De pH-waarde van het buffersysteem heeft, over het geteste gebied, geen invloed op de algemene parameters zoals algemene migratietijden en mobiliteiten, of efficiëntie. Wel is er individueel beschouwd een invloed op de migratietijden, mobiliteiten van iedere component en bijgevolg ook op de resolutie van twee nabijgelegen pieken.

Uit deze testen bleek dat bij de laagst geteste pH-waarde van 9.38, er geen selectiviteit was van de analyse voor de verschillende nucleotiden en hun adducten. Zoals blijkt uit figuur 2.9 zijn in het elektroferogram van deze analyse slechts twee

pieken aanwezig in het migratiegebied van de nucleotiden, dit is te wijten aan co-migratie van deze nucleotiden.



Wanneer de pH-waarde van de buffer lichtjes opgedreven wordt tot 9.68 neemt de selectiviteit van de methode sterk toe en zien we dat de vier nucleotiden nu gescheiden zijn (zie figuur 2.10), dit impliceert ook dat hun respectieve adducten nu ook gescheiden worden. Een verdere stijging van de pH-waarde verbetert de analyse niet maar geeft wel aanleiding tot een onderlinge verschuiving van de pieken. De invloed van de ingestelde pH-waarde op de analyse valt te verklaren door de veranderingen in de ionisatie van de te analyseren componenten. Het is dan ook vanzelfsprekend dat de optimalisatie van de pH-waarde sterk afhankelijk is van de te analyseren componenten en dat de optimale pH-waarde van de buffer enkel experimenteel bepaald kan worden.

Voor de verdere analyses werd geopteerd voor het gebruik van een buffersysteem met een pH-waarde van 9.68.

II.4.5. Injectie, detectielimieten en "sample stacking"-systeem

II.4.5.1. Detectielimieten

De detectielimieten van het analysesysteem werden geëvalueerd gebruik makend van een stockoplossing van 10 mg dAMP en 10 mg TMP in 10 ml milli-Q-water. Deze stock-oplossing werd vervolgens steeds verder verdund in milli-Q-water, de resultaten van dit onderzoek zijn weergegeven in tabel 2.3:

TABEL 2.3: Detectielimieten voor CZE-analyse van de nucleotiden dAMP en TMP.

	ΔP (mbar), t (sec)	staal concentratie (M)	L_p (mm)	V_p	hoeveelheid geïnjecteerd (fmol)	signaal/ruis verhouding
normale injectie	22, 12	2.9×10^{-5}	5	22 nl	640	5/1
"sample	220, 120	2.9×10^{-7}	500	2.2 μ l	640	5/1

stacking”

De geïnjecteerde hoeveelheid werd berekend met behulp van de formule van Hagen-Poiseuille (formule 11). Waarin L_p (mm) de lengte van de geïnjecteerde plug voorstelt, ΔP (mbar) het drukverschil aangelegd over het capillair, t (sec) de injectieduur, L (cm) de totale capillairlengte, η (cP) de viscositeit van het buffersysteem en d (μm) de inwendige capillairdiameter.

(11) **Fout!**

Deze formule kan herschreven worden om het geïnjecteerde volume (V_p in nl) te berekenen (formule 12).

(12) **Fout!**

Wanneer dit volume ingevuld wordt in de onderstaande formule (formule 13), waarin C (M) de staalconcentratie voorstelt, dan bekomt men de hoeveelheid staal die geïnjecteerd werd (H_i in fmol).

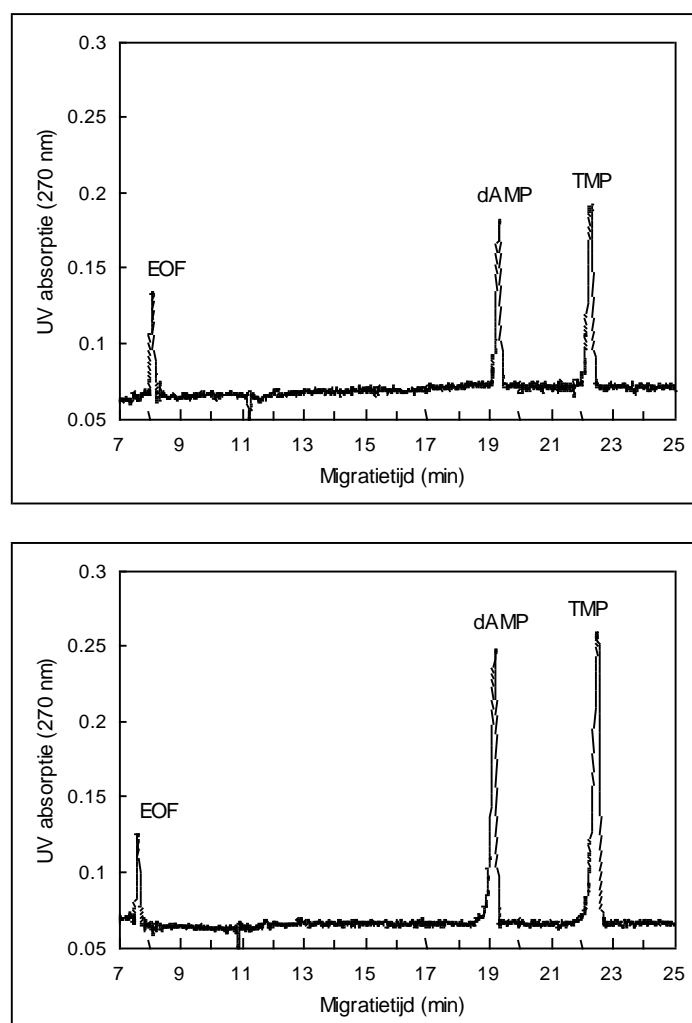
$$(13) H_i = V_p \cdot 10^6 C$$

Zoals blijkt uit tabel 2.3 bedraagt de detectielimiet bij normale injectie 2.9×10^{-5} M (S/R 5/1). Deze kan met een factor honderd verbeterd worden door het gebruik van de “sample stacking” techniek (2.9×10^{-7} M met S/R 5/1). Een detectielimiet van 640 fmol houdt in dat, wanneer rekening wordt gehouden met het beschikbaar zijn van 500 μg DNA bij *in-vivo* onderzoek, met behulp van de hier beschreven CZE-methode één adduct op 10^6 ongemodificeerde nucleotiden gedetecteerd zou kunnen worden. Weliswaar, zouden de ongemodificeerde nucleotiden preliminair uit het staal verwijderd moeten worden teneinde het capillair niet te overladen.

II.4.5.2. Optimalisatie van het “sample stacking”-systeem

Zoals uit de figuren 2.11 en 2.12 blijkt, is er geen verlies in resolutie in vergelijking met de oorspronkelijke scheiding bij het gebruiken van de hier beschreven “sample stacking”-techniek. Voor het uitvoeren van deze proeven

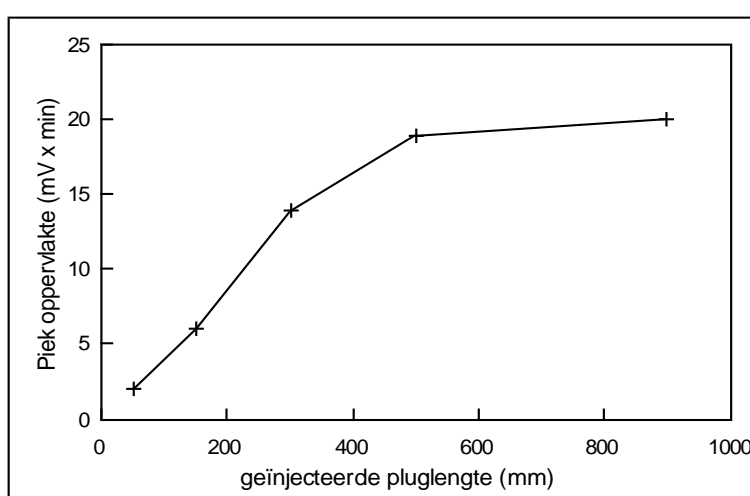
werden de verdunningen van het dAMP-TMP-mengsel geanalyseerd onder de geoptimaliseerde CZE-condities (100 mM ammoniumcarbonaat-buffer pH 9.68, spanning van 17 kV).



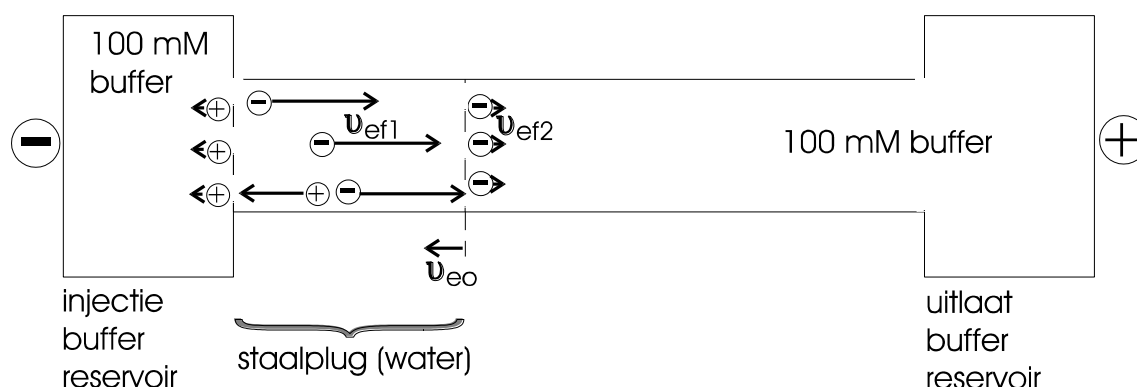
Het elektroferogram, bekomen na normale injectie (figuur 2.11), vertoont een resolutie van 9.696 voor de pieken van de nucleotiden dAMP en TMP. Dit, bekomen na “sample stacking” (figuur 2.12), vertoont een resolutie van 9.271 voor de pieken van dAMP en TMP. Gezien deze waarden nagenoeg gelijk zijn kan besloten worden dat het uitvoeren van de “sample stacking” geen nadelige invloed heeft op de resolutie van de scheiding.

Wanneer de piekoppervlakte uitgezet wordt in functie van de lengte

van de geïnjecteerde plug (figuur 2.13), dan valt op dat het injecteren van een plug groter dan 500 mm geen aanleiding geeft tot een evenredige toename in piekoppervlakte. Dit werd eveneens vastgesteld door Chien en Burgi (1992). De verklaring hiervoor is dat dit “sample stacking”-systeem gebaseerd is op het feit dat er over de staalplug een grotere veldsterkte heerst dan over de elektroforesebuffer, zodat de elektroforetische snelheid v_{ef1} in de staalplug groter is dan de elektro-osmotische snelheid v_{eo} (cm/sec).



Deze dienen beide eveneens groter te zijn dan de elektroforetische snelheid v_{ef2} in de elektroforesebuffer (zie figuur 2.14). Dit wordt weergegeven in de formules 14 en 15.



$$(14) \gamma_{\text{psilon}_{efx}} = E_x \mu_{ef}$$

$$(15) -\gamma_{\text{psilon}_{ef1}} > \gamma_{\text{psilon}_{eo}}$$

Volgens Chien en Burgi (1992) kan v_{ef1} eveneens berekend worden met formule 16 op voorwaarde dat de geleiding tussen de staalplug en het elektroforese-buffersysteem genoeg verschilt.

(16)Fout!

In deze formule is $E_0 (=V/L)$ gelijk aan de spanning (V) die aangelegd wordt over het capillair in verhouding tot de capillairlengte (L) en is $\lambda (=L_p/L)$ de relatieve lengte van de geïnjecteerde plug. Substitutie van $v_{eo} (= \mu_{eo}E_0)$ en formule 16 in formule 15 leert dat (formule 17):

$$(17) -\mu_{ef}/\lambda > \mu_{eo}$$

Zo kan de maximale relatieve pluglengte λ_{max} berekend worden die kan geïnjecteerd worden zonder verlies van het desbetreffende staalion met behulp van formule 18. Bemerk dat deze parameter bepaald wordt door μ_{ef} die kenmerkend is voor een bepaald ion. Het is dan ook vanzelfsprekend dat de λ_{max} afhankelijk zal zijn van de te analyseren ionen. Bovendien is het mogelijk dat in één analyse, bij een bepaalde injectielengte, de ionen met een lage μ_{ef} boven dit maximum zijn, terwijl de ionen met een hoge μ_{ef} dit niveau nog niet bereikt hebben. Dit geeft aanleiding tot een relatief aanconcentreren van de ionen met hoge μ_{ef} . De tweede factor is de μ_{eo} die vooral bepaald wordt door de bufferconcentratie van de elektroforesebuffer (Zie hoofdstuk II.4.2.1.). Gezien het aldaar bepaalde verband, is het ook logisch dat samen met het verhogen van de bufferconcentratie ook de plug die kan geïnjecteerd worden groter wordt en dus ook de efficiëntie van de techniek.

(18)Fout!

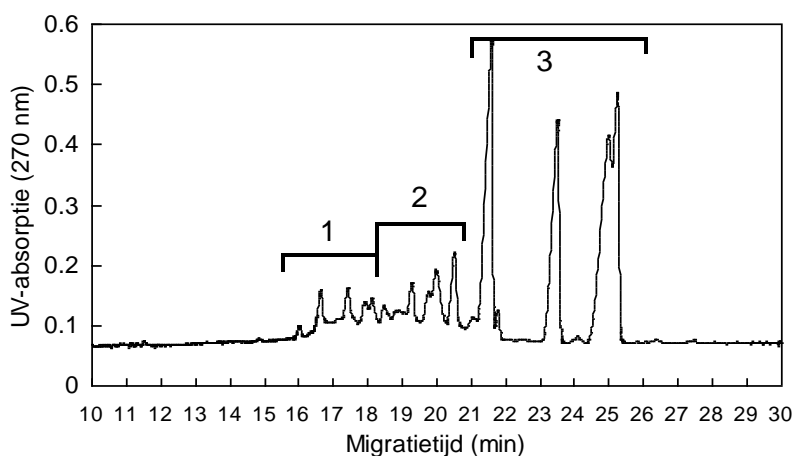
Gebruikmakend van deze formule en van de mobiliteiten bepaald in hoofdstuk II.4.2.1. kunnen we berekenen dat voor onze analyseomstandigheden en onze componenten de λ_{max} gemiddeld 0.54 bedraagt wat overeenstemt met een

pluglengte (L_p) van gemiddeld 500 mm.

II.4.6. Opzuivering op HR-P kolommen

In het elektroferogram (figuur 2.15) bekomen na CZE-analyse van het DNA-hydrolysaat, voor scheiding op de SPE-kolom, zijn naast de gevormde DNA-adducten, de ongemodificeerde nucleotiden, zoals verwacht, de hoofdcomponenten. Deze CZE-analyse werd uitgevoerd met de geoptimaliseerde CZE-condities (zijnde 100 mM ammoniumcarbonaatbuffer pH 9.68, 17 kV) en met gebruik van de “sample stacking”-techniek (injectie bij 120 mbar gedurende 0.2 minuten). Teneinde deze ongemodificeerde nucleotiden evenals de elektrolyten aanwezig in de DNA-hydrolysaten te verwijderen werd de in II.3.7. beschreven SPE-opzuivering ontwikkeld.

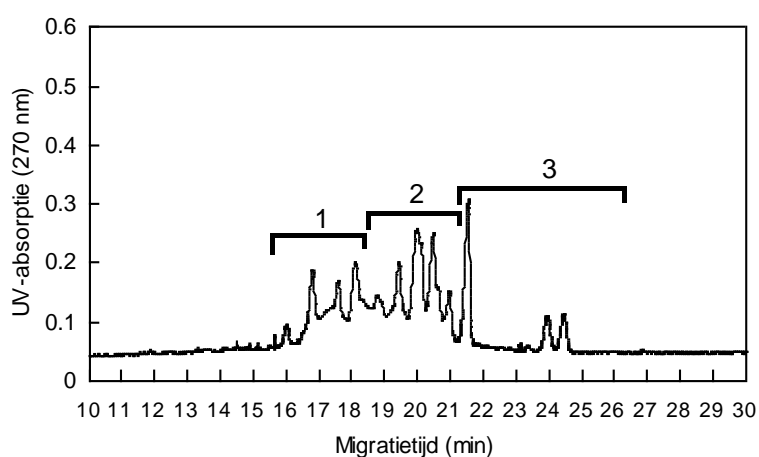
De fracties gecollecteerd na scheiding op de HR-P kolommen (zie hoofdstuk II.3.7) werden vervolgens geanalyseerd met de geoptimaliseerde CZE-condities en met gebruik van de “sample stacking”-techniek (injectie bij 120 mbar gedurende 0.2 minuten). De resultaten van dit onderzoek zijn samengevat in tabel 2.4.



TABEL 2.4: Identificatie met behulp van CZE-analyse van de componenten aanwezig in de fracties (telkens 1 ml van het weergegeven eluens, zie ook hoofdstuk II.3.7)

fracties	eluens	aanwezige componenten
1 - 3	water	elektrolyten ongemodificeerde nucleotiden
4 - 6	water	restant ongemodificeerde nucleotiden
7 - 8	methanol/water 50/50	adducten
9 - 13	methanol	restant adducten

In het elektroferogram bekomen na CZE-analyse van fractie 7 van de SPE-opzuivering (figuur 2.16), wat de eerste fractie is die methanol bevat (50% in water), worden alle adducten aanwezig in het DNA-hydrolysaat, ook de dinucleotideadducten (zie figuur 2.15), teruggevonden. In de fractie daarvoor (fractie 6, 100% water) werden geen adducten teruggevonden, waaruit we kunnen besluiten dat alle adducten tijdens het spoelen met water efficiënt op de SPE-kolom worden weerhouden.

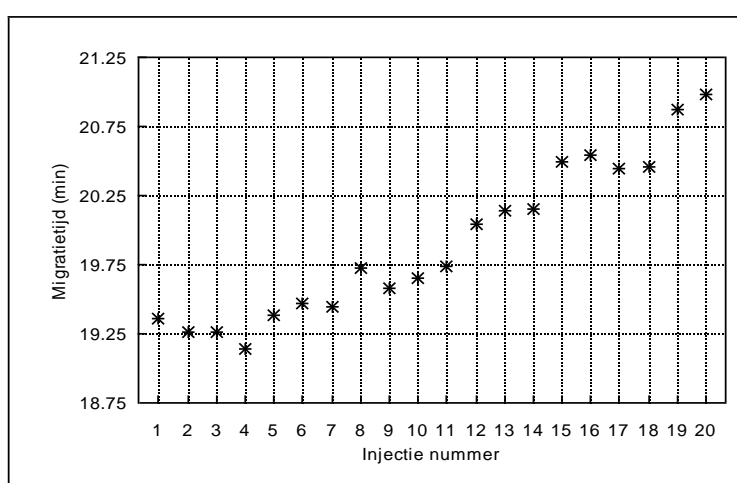


Gebruikmakend van deze SPE-extractie konden dus op een heel efficiënte wijze de zouten en de ongemodificeerde nucleotiden uit het DNA-hydrolysaat verwijderd worden. Met als gevolg dat de adducten niet alleen geconcentreerd werden maar dat ze aanwezig waren in een oplossing met lage geleiding waardoor ze efficiënt konden worden geconcentreerd met de “sample stacking”-techniek. Bovendien kon een grotere hoeveelheid adducten worden geïnjecteerd op het capillair, zonder dit te overladen (dankzij het verwijderen van de ongemodificeerde nucleotiden).

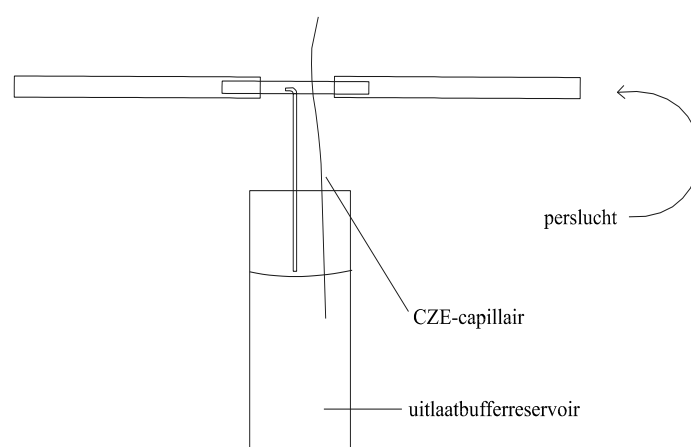
Voor verdere analyses werden de fracties 9 tot en met 13 na droogdampen opgelost in de overblijvende waterfase bekomen door indampen van fracties 7 en 8. Zodoende werden alle adducten verzameld in één staal.

II.4.7. Reproduceerbaarheid van de migratietijden

Een van de problemen bij CZE is de reproduceerbaarheid van de migratietijden, dit probleem is verbonden met het hydrodynamisch nivelleren van de in- en uitlaatbuffer (Stregge en Lagu, 1993; Smith et al., 1991). De reproduceerbaarheid van de migratietijden werd onderzocht met behulp van het reactiemengsel van dAMP met PGE. Het 100 mM ammoniumcarbonaat-buffersysteem (pH 9.68) werd gebruikt, samen met een normale injectie (10 mbar 0.2 minuten), in 20 opeenvolgende analyses. Zeven inlaat-buffervaatjes werden gebruikt, die elk voor 3 analyses werden gebruikt. De reproduceerbaarheid werd getest bij een constante stroom (195 μ A) of een constante spanning (17 kV). In alle gevallen werden de beste resultaten bekomen bij het instellen van een constante stroom. De verklaring hiervoor is dat het CZE-toestel dat door ons gebruikt werd een maximale stroom van 200 μ A kon leveren, wat overeenstemt met ongeveer 17 kV bij het gebruiken van het hier beschreven buffersysteem. Bij het starten van de analyse bij 17 kV bedraagt de stroom ongeveer 175 μ A, gedurende de analyse echter loopt deze op, ten gevolge van de Joule-verhitting, tot de limiet van 200 μ A. Na het bereiken van deze limiet houdt het toestel de stroom constant op 200 μ A door de spanning aan te passen.

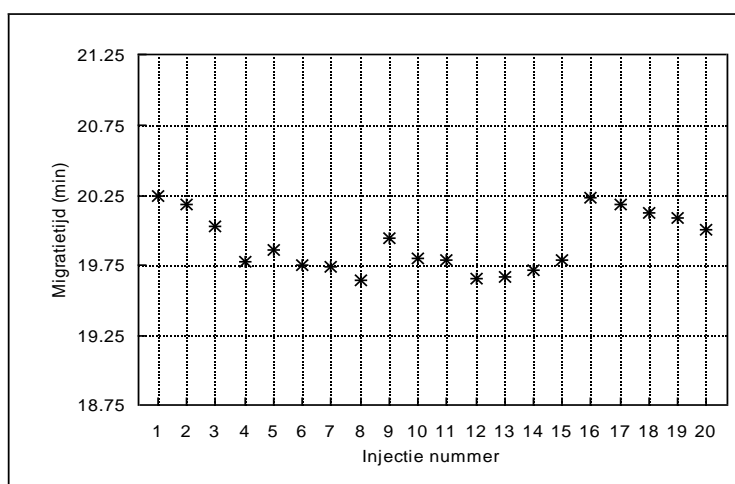


Het is dan ook vanzelfsprekend dat de analyse onder meer reproduceerbare omstandigheden doorgaat wanneer onmiddellijk een constante stroom wordt geprogrammeerd. De test uitgevoerd met een constante stroom geeft het resultaat, voor de migratietijd van de nucleotide piek, weergegeven in figuur 2.17. De migratietijden vertonen een systematisch stijgende trend, wat een negatieve invloed heeft op de reproduceerbaarheid (variatiecoëfficiënt (VC) = 0.0249, wat overeenstemt met een procentuele fout van 2.5%). Deze trend wordt veroorzaakt door het geleidelijk toenemen van het vloeistofniveau in het uitlaatbufferreservoir (door het spoelen van het capillair tussen de analyses en de door de EOF veroorzaakte vloeistofstroom). Het verhoogde vloeistofniveau veroorzaakt een hydrodynamische terugvloeï door het capillair die tegengesteld is aan de EOF, waardoor de migratietijden geleidelijk aan toenemen, en de reproduceerbaarheid afneemt. Om dit probleem op te lossen hebben wij een systeem geconstrueerd dat gedurende de opeenvolgende analyses het vloeistofniveau in het uitlaatreervoir op constante hoogte hield. Dit systeem werd opgebouwd uit een aantal plastiekleidingen en een glazen capillair (zie figuur 2.18).



Het uiteinde van het glazen capillair (lengte 8 cm, i.d. 750 μm) werd in een bunsenvlam gebogen onder een hoek van 90° op een afstand van ongeveer 0.5 cm van het einde. De gebogen tip werd dan door een dun stukje plastiekleiding geduwd, dat aan beide zijden werd aangesloten op bredere plastiekleidingen. Via deze

plastiekleiding werd een matige luchtstroom langs de gebogen tip geleid. Het uiteinde van het glazen capillair werd net boven het niveau van het uitlaatbufferreservoir gepositioneerd. Wanneer het vloeistofniveau in dit reservoir nu stijgt dan zuigt dit systeem de overtollige hoeveelheid vloeistof weg. Het resultaat bekomen met dit systeem is weergegeven in figuur 2.19. Dankzij dit systeem wordt een reproduceerbaarheid voor de retentietijden bekomen met een VC van 0.0092, wat overeenstemt met een relatieve procentuele fout van minder dan 1.0%.



II.5. Besluit

Alle kritische parameters voor de CZE-analyse van DNA-adducten werden bepaald en de CZE-scheiding van alle componenten aanwezig in het DNA-hydrolysaat werd geoptimaliseerd. De detectielimiet was van een grootteorde die DNA-adductonderzoek *in vivo* mogelijk maakt. Bovendien werd de gevoeligheid van de CZE-analyse met een factor honderd verhoogd door het op punt stellen van een “sample stacking”-systeem. Tevens werd een SPE-opzuivering ontwikkeld teneinde de DNA-adducten uit de DNA-hydrolysaten te concentreren en het staal te ontzouten. We kunnen dus besluiten dat een CZE-analysemethodologie op punt gesteld werd die geschikt is voor DNA-adductonderzoek zowel *in vitro* als *in vivo*.

II.6. Referenties

- Beckers JL. Isotachophoresis superimposed on capillary zone electrophoresis. J. Chromatogr. A. 1993, 641, 363-373.
- Beckers JL and Ackermans MT. Effect of sample stacking on resolution, calibration graphs and pH in capillary zone electrophoresis. J. Chromatogr. A. 1993b, 629, 371-378.
- Burgi DS and Chien RL. Improvement in the method of sample stacking for gravity injection in capillary zone electrophoresis. Anal. Biochem. 1992, 202, 306-309.
- Chen L, Devanesan PD, Higginbotham S, Ariese F, Jankowiak R, Small GJ, Rogan EG and Cavalieri EL. Expanded analysis of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in vitro and in mouse skin: Their significance in tumor initiation. Chem. Res. Toxicol. 1996, 9, 897-903.
- Chien RL and Burgi DS. Sample stacking of an extremely large injection volume in high-performance capillary electrophoresis. Anal. Chem. 1992, 64, 1046-1050.
- Edmonds CG, Loo JA, Bariniga CJ, Udseth HR and Smith RD. Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 1989, 474, 21-37.
- Farmer PB. Carcinogen adducts: Use in diagnosis and risk assesment. Clin. Chem. 1994, 40/7, 1438-1443.
- Försti A, Staffas J and Hemminki K. Comparison of TLC- and HPLC-³²P-postlabelling assay for cisplatin-DNA adducts. Carcinogenesis. 1994, 15, 2829-2834.
- Heiger DN. High Performance Capillary Electrophoresis-An introduction. Hewlett-Packard, Germany, 1992.
- Hirokawa T, Ohmori A and Kiso Y. Analysis of a dilute sample by capillary zone electrophoresis with isotachophoretic preconcentration. J. Chromatogr. A. 1993, 634, 101-106.
- Issaq HJ, Atamna IZ, Muschik GM and Janini GM. The effect of electric field strength, buffer type and concentration on separation parameters in capillary

zone electrophoresis. Chromatographia. 1991, 32, 155-161.

- Kaniansky D, Marak J, Madajova V and Simunicova E. Capillary zone electrophoresis of complex ionic mixtures with on-line isotachophoretic sample pretreatment. J. Chromatogr. A. 1993, 638, 137-146.

-
- Krivankova L, Gebauer P, Thormann W, Mosher RA and Bocek Petr. Options in electrolyte systems for on-line combined capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis. J. Chromatogr. A. 1993, 638, 119-135.
 - Kuhr WG and Monning CA. Capillary electrophoresis. Anal. Chem. 1992, 64, 389R-407R.
 - Lemière F, Esmans EL, Van Dongen W, Van den Eeckhout E and Van Onckelen H. Evaluation of liquid chromatography-thermospray mass spectrometry in the determination of some phenylglycidyl ether-2'-deoxynucleoside adducts. J. Chromatogr. A. 1993, 647, 211-218.
 - Lemière F, Joos P, Vanhoutte K, Esmans EL, De Groot A, Claeys M and Van den Eeckhout E. Phenylglycidyl ether adducts of 2'-deoxycytidine and 2'-deoxyadenosine: Stability in solution and structure analysis by electrospray tandem mass spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectr. 1996, 7, 682-691.
 - Lukacs KD and Jorgenson JW. Capillary Zone Electrophoresis: effect of physical parameters on separation efficiency and quantitation. HRC & CC 1985, 8, 407-411.
 - Norwood CB, Jackim E and Cheer S. DNA adduct research with capillary electrophoresis. Anal. Biochem. 1993, 194-199.
 - Plna K, Segerbäck D and Schweda EKH. DNA adduct formation by allyl glycidyl ether. Carcinogenesis. 1996, 17, 1465-1471.
 - Randerath K, Reddy MV and Gupta RC. ³²P-postlabeling test for DNA damage. P. Natl. Acad. Sci. USA. 1981, 78, 6126-6129.
 - Rasmussen HT and McNair HM. Influence of buffer concentration, capillary internal diameter and forced convection on resolution in capillary zone electrophoresis. J. Chromatogr. A. 1990, 516, 223-231.
 - Reddy MV, Gupta RC, Randerath E and Randerath K. ³²P-postlabeling test for covalent DNA binding of chemicals *in vivo*: application to a variety of aromatic carcinogens and methylating agents. Carcinogenesis. 1984, 5, 231-243.
 - Reinhoud NJ, Tjaden UR and van der Greef J. Automated isotachopheretic analyte focusing for capillary zone electrophoresis in a single capillary using hydrodynamic back-pressure programming. J. Chromatogr. A. 1993, 641, 155-162.
 - Schmeiser HH, Bieler CA, Wiessler M, van Ypersele de Strihou C and Cosyns

- J-P. Detection of DNA adducts formed by aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese Herbs nephropathy. *Cancer Res.* 1996, 56, 2025-2028.
- Sharma M, Jain R, Ionescu E and Slocum HK. Capillary electrophoretic separation and laser-induced fluorescence detection of the major DNA adducts of cisplatin and carboplatin. *Anal. Biochem.* 1995, 228, 307-311.
 - Smith SC, Strasters JK and Khaledi MG. Influence of operating parameters on reproducibility in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 1991, 559, 57-68.
 - Stevens TS and Cortes HJ. Electroosmotic propulsion of eluent through silica based chromatographic media. *Anal. Chem.* 1983, 55, 1365-1370.
 - Strege M and Lagu AL. Studies of migration time reproducibility of capillary electrophoretic protein separations. *J. Liq. Chromatogr.* 1993, 16, 51-68.
 - Thompson TJ, Foret F, Vouros P and Karger BL. Capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry: improvement of protein detection limits using on-column transient isotachophoretic sample preconcentration. *Anal. Chem.* 1993, 65, 900-906.
 - Tsuda T, Nomura K and Nakagawa G. Open-tubular microcapillary liquid chromatography with electro-osmosis flow using a UV detector. *J. Chromatogr. A.* 1982, 248, 241-247.
 - Udseth HR, Loo JA and Smith RD. Capillary isotachopheresis/Mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1989, 61, 228-232.
 - Van den Eeckhout E, Coene J, Claereboudt J, Borremans F, Claeys M, Esmans E and Sinsheimer JE. Comparison of the isolation of adducts of 2'-deoxycytidine and 2'-deoxyguanosine with phenylglycidyl ether by high-performance liquid chromatography on a reversed-phase column and a polystyrene-divinylbenzene column. *J. Chromatogr. A.* 1991, 341, 317-331.
 - Vanhoutte K, Joos P, Lemièrre F, Van Dongen W, Esmans EL, Claeys M and Van den Eeckhout E. Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry of the DNA adducts formed between 2'-deoxynucleosides and bisphenol A diglycidyl ether. *J. Mass Spectrom.* 1995, 30, 1453-1461.
 - Vanhoutte K, Van Dongen W, Esmans EL, Van den Eeckhout E and Van Onckelen H. A strategy for the identification of 2'-deoxynucleoside and 2'-deoxynucleotide adducts using electrospray tandem mass spectrometry. *Eur. Mass Spectrom.* 1996, 2, 181-192.
 - Vanhoutte K, Van Dongen W, Hoes I, Lemièrre F, Esmans EL, Van Onckelen

H, Van den Eeckhout E, van Soest REJ and Hudson AJ. Development of a nanoscale liquid chromatography/electrospray mass spectrometry methodology for the detection and identification of DNA adducts. *Anal. Chem.* 1997, 69, 3161-3168.

- Wellemans J, Cerny RL and Gross ML. Tandem mass spectrometry for the determination of deoxyribonucleic acid damage by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analyst*, 1994, 119, 497-503.
- Wolf SM, Vouros P and Norwood C. Identification of Deoxynucleoside-polyaromatic hydrocarbon adducts by capillary zone electrophoresis-continuous flow-fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 1992, 3, 757-761.
- Wolf SM and Vouros P. Incorporation of sample stacking techniques into the capillary electrophoresis CF-FAB mass spectrometric analysis of DNA adducts. *Anal. Chem.* 1995, 67, 891-900.

Hoofdstuk III: Ontwikkeling van een CZE on-line ES-MS- en ES-MS/MS- techniek voor de identificatie van 5'-monofosfaatnucleotideadducten.

III.1. Literatuuroverzicht

III.1.1. Overzicht van de bestaande ionisatiemethoden

Teneinde componenten met behulp van bestaande massaspectrometrische technieken te kunnen bepalen moet de te analyseren component in een ionaire vorm (zijnde positief of negatief) in de gasfase gebracht worden.

Wanneer de component een stof is die onder normale omstandigheden als gas voorkomt of indien hij zonder ontbinding kan vervluchtigd worden kan de ionisatie op een eenvoudige manier gebeuren door botsing met hoog energetische elektronen (elektron impact ionisatie, EI), fotonen (foton impact ionisatie, FI) of ionen (chemische ionisatie, CI). Deze technieken worden veelvuldig gebruikt in combinatie met GC, daar deze techniek de component aanbrengt in de gasfase.

Voor de componenten die niet vluchtig zijn of niet vervluchtigd kunnen worden zonder al te drastische ontbinding werden een aantal “zachte” ionisatietechnieken ontwikkeld, die in twee categorieën kunnen onderverdeeld worden: de impuls-energetischemethoden en de veld-desorptiemethoden. In deze eerste groep vinden we de laserdesorptie-ionisatie (LD), plasmadesorptie (PD), “Fast atom bombardment” (FAB) en “Fast ion bombardment” (FIB). Vooral LD en FAB zijn wijdverspreide technieken. Dankzij de ontwikkeling van continue FAB-technieken, zoals “continuous flow FAB” waarbij de componenten in een vloeibare matrix op een continue wijze in de FAB-bron aangeboden worden, kan deze ionisatietechniek aangewend worden voor *on-line* koppelingen met HPLC-

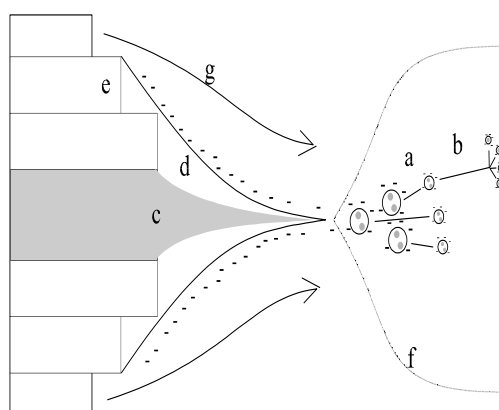
(Fenn et al., 1990) en CZE-technieken (Wolf et al., 1992).

De tweede groep maakt gebruik van heel sterke elektrostatische velden om ionen uit het substraat te extraheren in een begeleidende gasstroom (meestal stikstofgas), omvat de veelgebruikte technieken die aangeduid worden als thermospray (TSP) en elektropray (ES). De TSP-ionisatietechniek onderscheidt zich van de ES-techniek, die hierna uitvoerig besproken zal worden, doordat hier de druppelvorming berust op het verdampen van het solvent door dit door een verhit capillair te leiden. Evenals ES (Vanhoutte et al., 1996; Lemière et al., 1996) is deze techniek geschikt voor de *on-line* koppeling met HPLC (Fenn et al., 1990; Lemière et al., 1993; Vanhoutte et al., 1995). De grote vloeistofstroom die nodig is voor TSP ($> 100 \mu\text{l/min}$) maakt deze techniek echter ongeschikt voor koppeling met CZE die heel lage vloeistofstromen genereert ($\leq 1 \mu\text{l/min}$).

III.1.2. Het elektroprayproces

Niettegenstaande het gebruik van elektropray-ionisatie relatief recent is, werd het fenomeen reeds uitvoerig bestudeerd (Smith et al., 1990). Productie van ionen gedurende het ES-proces gebeurt in twee stappen: dispersie van sterk geladen druppels bij atmosferische druk, gevolgd door druppellevaporatie. Een ES wordt gevormd door een sterk elektrisch veld aan te leggen op een kleine vloeistofstroom ($1\text{-}10 \mu\text{l/min}$) die uit een capillair vloeit. Een potentiaal-verschil van 3 à 6 kV wordt daarbij aangelegd tussen het capillair en de “counter”-elektrode (die zich op een afstand van 0.3 tot 2 cm bevindt). Dit elektrisch veld leidt tot een accumulatie van lading op het vloeistofoppervlak aan het capillairuiteinde, wat resulteert in een verstoring van het vloeistofoppervlak en de vorming van sterk geladen druppeldeeltjes. Dit proces wordt aangeduid met de benaming “Taylor cone” (Fenn et al., 1990; Smith et al., 1993) (figuur 3.1). Afhankelijk van het aangelegde elektrische veld kunnen die druppels negatief of positief geladen zijn. Men spreekt respectievelijk van negatieve ES (-ES) en positieve ES (+ES). Meestal wordt dit proces bevorderd door het sproeien van een vernevelingsgas (meestal stikstofgas) over de capillairtip, wat resulteert in een fijne nevel van druppeltjes. Op een korte afstand van het capillair is de druppeldiameter meestal uniform en in de

grootteorde van 1 μm . De vorming van moleculaire ionen uit deze druppels wordt beïnvloed door de condities die invloed hebben op de verdamping van deze druppels. Dit kan door het wijzigen van de druk van het vernevelingsgas, door het verwarmen van de interface of door energetische collisione tussen de druppels. De druppels gaan inkrimpen tot het punt waarop de “Coulomb”-repulsieve krachten de cohesieve krachten die de druppel bijeenhouden (zoals de oppervlaktespanning) evenaren, dit wordt de “Rayleigh”-limiet genoemd.



Twee mechanismen worden beschreven voor de vorming van moleculaire ionen uit geladen druppels: splitsing van de druppel wanneer de “Rayleigh”-limiet wordt bereikt en directe evaporatie van geladen ionen. Wanneer de “Rayleigh”-limiet bereikt wordt, wordt de druppel instabiel en wordt tijdens een “Coulomb”-explosie een reeks dochterdruppels gevormd die dezelfde cyclus opnieuw ondergaan (Fenn et al., 1990). Een veldsterkte van ongeveer 10^8 V/m is nodig voor de evaporatie van geladen ionen uit een druppel (zoals voorgesteld in het tweede mechanisme). De maximale lading die een druppel kan dragen is voor de “Rayleigh”-splitsing proportioneel aan $d^{3/2}$ (d = druppel diameter) en aan d^2 voor het directe evaporatiemechanisme. Uit experimenten van Iribarne en Thomson (1976; Thomson en Iribarne, 1979) blijkt dat voor de vorming van ionen uit geladen waterige druppels met een diameter $> 1\mu\text{m}$, de “Rayleigh”-limiet bereikt wordt en dat de druppels exploderen met de vorming van kleinere druppels. Er werd verondersteld dat de druppels een cascade van splitsingsprocessen ondergaan tot de druppels klein

genoeg zijn om het ion-evaporatieproces te laten doorgaan.

Andere onderzoekers beweren dan weer dat de veldsterkte nodig voor ion-evaporatie zelfs voor de allerkleinste waterdruppels bijna altijd de veldsterkte voor “Rayleigh”-splitsing overschrijdt. Zij gaan ervan uit dat “Rayleigh”-splitsing doorgaat tot de laatste hoeveelheid solvent van de druppel verdampt is en er dus slechts nog de component overblijft die dan de lading overneemt.

Alhoewel er dus nog enige onenigheid bestaat over de details van de onderliggende mechanismen verantwoordelijk voor ES, blijkt dat deze methode gebruikt kan worden voor de ionisatie van biomoleculen (proteïnen) met een moleculairgewicht hoger dan 100000 Da (Smith et al., 1990), waarbij deze intact blijven en meervoudig geladen worden.

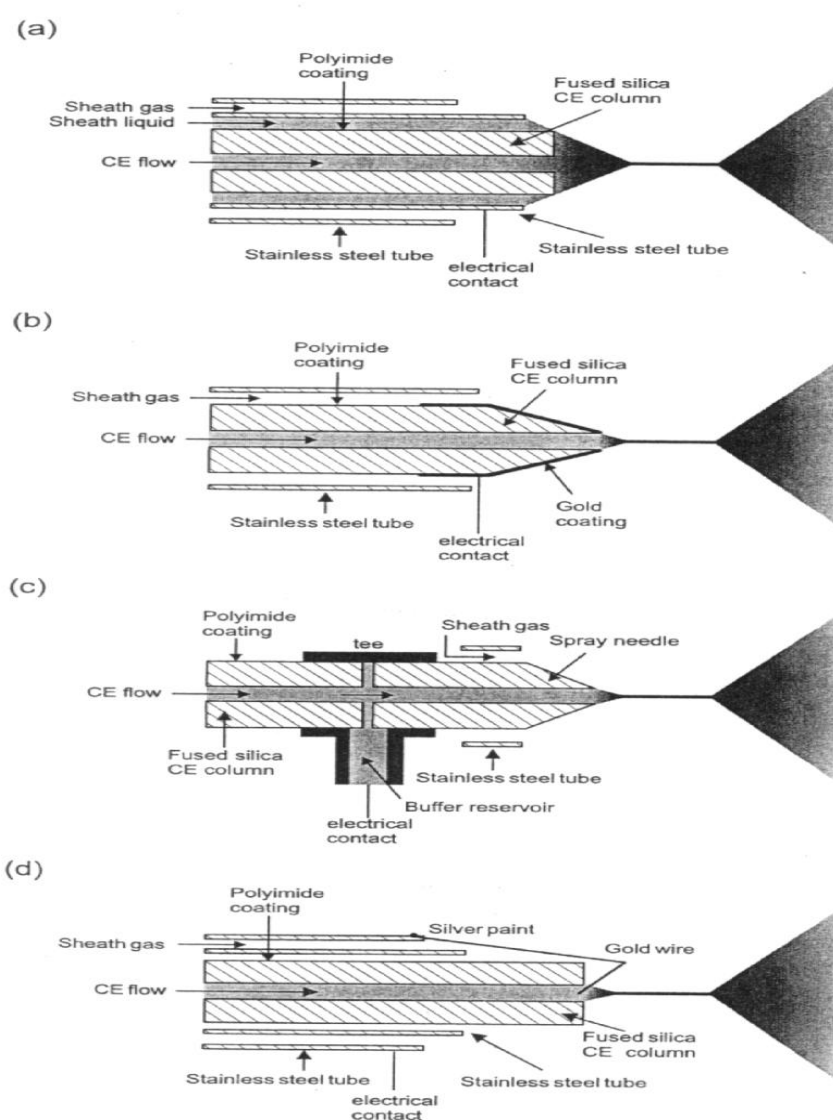
III.1.3. CZE-ES-MS-koppelingstechnieken

Dankzij de compatibiliteit van de kleine vloeistofstroom gegenereerd door CZE ($\leq 1 \mu\text{l/min}$) en het kleine debiet nodig voor ES ($1\text{-}10 \mu\text{l/min}$), en het feit dat beide technieken optimaal zijn (en ook vooral gebruikt worden) voor de analyse van ionaire componenten in oplossing, konden beide technieken *on line* gekoppeld worden (Smith et al., 1988). Om beide technieken succesvol te kunnen koppelen moesten een aantal instrumentele aspecten opgelost worden. Een eerste probleem was het ontbreken van een bufferreservoir aan het capillairuiteinde en de nood om een elektrisch contact te hebben aan dit uiteinde, niet alleen voor het CZE-proces maar ook voor het ES-proces. Een tweede probleem was dat de vloeistof om een stabiele ES te bekomen een voldoende lage oppervlaktespanning en een lage geleiding moest bezitten (Smith et al., 1988). Om deze problemen op te lossen werden verschillende opstellingen bedacht.

III.1.3.1. Gebruik van een “sheath flow”

Dit is waarschijnlijk de meest gebruikte CZE-ES-koppelingstechniek (Banks, 1997). Hierbij wordt rond het CZE-capillair een “sheath”-vloeistof gepompt die aan het capillair uiteinde mengt met de vloeistof die uit het CZE-capillair migreert (zie figuur 3.1 en 3.2). Via een derde concentrisch metalen capillair wordt het

vernevelingsgas toegevoegd dat helpt bij de vorming van een stabiele spray of een gas dat vrije elektronen capteert (SF_6) om vonkvorming tegen te gaan (vooral gebruikt bij -ES). Het vernevelingsgas bevordert eveneens het verdampen van het solvent uit de druppels en gaat clustervorming tegen.



Het elektrisch contact, nodig voor de CZE-scheiding en het ES-proces, wordt bewerkstelligd via de “sheath”-vloeistof, door op het stalen capillair de spanning voor

ES aan te brengen. In deze opstelling wordt een “sheath”-vloeistof gekozen die over goede ES-eigenschappen beschikt, zijnde een lage oppervlaktespanning en een lage geleidbaarheid (voor +ES wordt meestal gebruik gemaakt van methanol, acetonitrile of aceton en voor -ES meestal van isopropanol (Edmonds et al., 1989) in beide gevallen in combinatie met een laag geconcentreerde buffer). Deze “sheath”-vloeistof wordt meestal aangebracht aan een debiet van 1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$, terwijl het CZE-debiet hoogstens enkele honderden nl/min bedraagt, waardoor het ES-proces gedomineerd wordt door de “sheath”-vloeistof. Gezien een CZE-buffer al te dikwijls niet over goede ES-eigenschappen beschikt (bvb. door de aanwezigheid van te veel water of een te hoge geleiding), wordt het dankzij het gebruik van deze opstelling mogelijk om een groter aantal CZE-buffers te gebruiken in combinatie met ES. Bovendien biedt deze techniek het grote voordeel dat de CZE-capillairen weinig tot niet gemodificeerd dienen te worden.

De fysische ruimte waar het CZE-effluent en de “sheath”-vloeistof samenkomen en mengen is beperkt waardoor de bandverbreding door diffusie beperkt blijft. Het nadeel van deze techniek is dat samen met de “sheath”-vloeistof een aantal onzuiverheden en bufferzouten kunnen worden geïntroduceerd waardoor de chemische achtergrond sterk kan stijgen en de gevoeligheid kan dalen, deze daling in gevoeligheid is echter veel minder dramatisch dan oorspronkelijk gedacht werd (Smith et al., 1993). Een tweede probleem volgt uit het gebruik van een “sheath”-vloeistof die een andere samenstelling heeft dan de CZE-buffer, waardoor in het CZE-capillair een heterogeen buffersysteem kan ontstaan dat een invloed kan hebben op de migratietijden van de componenten (Banks, 1997).

III.1.3.2. De “sheathless”-methode

De eerste CZE-ES-MS-koppeling ooit beschreven was van dit type (Smith et al., 1988). In het originele design werd het capillairuiteinde in een stalen capillair geplaatst en werd de capillairpunt geleidend gemaakt door er een laagje zilver op aan te brengen. In de recentere ontwerpen wordt het capillairuiteinde in een punt getrokken (of gescherpt) die vervolgens met metaal wordt gecoat om het elektrisch contact mogelijk te maken (figuur 3.2). De methode met de directe

elektrode, waarbij een gouden draadje in het capillairuiteinde wordt gebracht is een variante van deze “sheathless”-methode. Deze techniek heeft het voordeel dat de uit het CZE-capillair migrerende componenten niet verdund worden in een “sheath”-vloeistof waardoor deze techniek gevoeliger kan zijn dan de “sheath flow”-methode, vooral wanneer capillairen met een geringe interne diameter worden gebruikt, 10 μm (Smith et al., 1993). Als opmaakgas wordt hier meestal SF_6 gebruikt om ontladingsverschijnselen aan de tip tegen te gaan. Dit gas heeft hier echter geen functie, noch in de druppelvorming noch in de verneveling, die hier enkel te wijten is aan het ES-proces.

In deze opstelling kunnen enkel CZE-buffers gebruikt worden die compatibel zijn met het ES-proces en dus over een voldoende lage oppervlaktespanning en geleiding beschikken. Alhoewel het gebruik van hele scherpe tips (met kleine interne en externe diameter) aanleiding geeft tot hogere elektrische velden en dus de restricties op de CZE-buffer minder streng maken, is het gebruik van minstens 10% organisch solvent in de CZE-buffer nodig om een efficiënte ES te bekomen.

Gezien de nood voor speciale capillairen of modificaties ervan is deze techniek niet zo populair als de “sheath flow”-methode. De metaalcoating op de capillairtip heeft ook een beperkte levensduur (enkele dagen) en moet dus frequent vervangen worden (Smith et al., 1988). De hoge kostprijs in aanmerking nemende van dergelijke gecoate capillairen met een scherpe tip verklaart het minder frequent gebruik van deze techniek.

III.1.3.3 De “liquid junction”-koppeling

In deze opstelling wordt het uiteinde van het CZE-capillair via een laag-dood volume-T-stuk gekoppeld met de ES-naald. In dit T-stuk wordt het opmaaksolvent voor ES toegevoegd dat eveneens zorgt voor het elektrische contact, zowel voor CZE als voor ES (zie Figuur 3.2). In deze opstelling is het elektroforeseproces gedeeltelijk ontkoppeld, zowel elektrisch als fysisch, van het elektroprayproces en problemen van competitieve vloeistof-stromen veroorzaakt door CZE en ES zijn aldus geminimaliseerd. Evenals bij de “sheath flow”-methode

wordt hier meestal via een concentrisch capillair een vernevelingsgas toegevoegd dat helpt bij de vorming van een stabiele spray (Banks, 1997).

III.1.4. Technieken om de stalen on line te concentreren in CZE-ES-MS

Een probleem bij CZE in het algemeen, en in het bijzonder in combinatie met ES-MS is de beperkte hoeveelheid staal die kan geïnjecteerd worden (slechts 1 à 2 % van de totale capillairlengte) (Edmonds et al., 1989). Teneinde grotere hoeveelheden staal te kunnen injecteren en als dusdanig de detectielimieten naar beneden te halen werden een aantal concentratietechnieken ontwikkeld die bruikbaar zijn in combinatie met massaspectrometrie.

III.1.4.1. Technieken gebaseerd op capillaire isotachoforese (CITP)

In isotachoforese migreren alle componenten door het scheidingsmedium aan een finaal gelijke snelheid. Alhoewel hetzelfde toestel, en dezelfde principes als voor CZE worden gebruikt zijn er enkele fundamentele verschillen. CITP verdraagt de injectie van veel grotere hoeveelheden staal dan CZE en is zelfs in staat om de concentratie van de te scheiden componenten te verhogen (Udseth et al., 1989). De techniek bestaat erin dat het capillair initieel gevuld wordt met een "leading"-elektrolyt die over een hogere mobiliteit beschikt dan de staalcomponenten, vervolgens wordt het staal geladen in een brede tweede band en daarna wordt het capillair aan de injectiezijde in een buffervaatje gebracht dat het "terminating"-elektrolyt bevat dat over een lagere mobiliteit beschikt dan de staalcomponenten. Wanneer dan een elektrisch veld wordt aangebracht zullen alle componenten zich rangschikken in het capillair volgens hun mobiliteit in aangrenzende banden en wordt er een evenwichtstoestand bereikt waarbij alle banden met dezelfde snelheid migreren. De breedte van de band is proportioneel met de concentratie van de desbetreffende component. Het voordeel van CITP is dat veel meer staal kan geladen worden waardoor CITP 100-maal gevoeliger is dan conventionele CZE (Smith et al., 1990). CITP werd dan ook reeds toegepast in combinatie met ES-MS (Udseth et al., 1989) en geeft inderdaad aanleiding tot hoge

gevoeligheden (grootteorde van 10^{-7} M in “full scan”). De belangrijkste nadelen van deze techniek zijn dat de componenten alle naast elkaar migreren en lichtjes overlappen waardoor CITP praktisch ongeschikt wordt voor gebruik met UV-detectie (daar in dat geval één brede piek gedetecteerd wordt). Bovendien migreren laag geconcentreerde componenten in heel smalle zones (soms minder dan 1 sec.) (Thompson et al., 1993), waardoor CITP minder geschikt is voor DNA-adductonderzoek, daar in dergelijk onderzoek de adducten in veel gevallen slechts in minieme hoeveelheden voorkomen ten opzichte van de ongemodificeerde nucleotiden. Bovendien is het vinden van geschikte “leading”- en “terminating”-elektrolyten niet altijd eenvoudig.

Een oplossing voor de eerste twee problemen werd geleverd door de combinatie van een *on-line* CITP-concentratie gevolgd door CZE-ES-MS (Thompson et al., 1993). In deze variant wordt het capillair initieel gevuld met “terminating”-elektrolyt. Na injectie van het staal, opgelost in een buffer met het “leading”-elektrolyt, wordt het capillairuiteinde opnieuw in het “terminating”-elektrolyt gebracht. Wanneer nu een elektrisch veld wordt aangelegd vindt eerst een CITP-concentratie plaats zoals bij conventionele CITP. Wanneer deze voltooid is start automatisch een CZE-scheiding doordat het “leading”-elektrolyt gemigreerd is in het “terminating”-elektrolyt en aldus een uniform buffersysteem ontstaat. Deze techniek combineert de gevoeligheid van CITP met de scheidingscapaciteit van CZE. Een nadeel is de noodzaak om een geschikt “terminating”-elektrolyt te vinden. Bovendien zijn deze elektrolyten meestal niet vluchtig wat problemen kan opleveren in combinatie met ES-MS.

III.1.4.2. “Sample stacking”

De mogelijkheid om “sample stacking” uit te voeren, zoals beschreven in Hoofdstuk II, in combinatie met ES-MS werd aangetoond door Schrader en Linscheid (1995). Hoewel dit werk nog niet gepubliceerd was toen wij onze techniek ontwikkelden, vertoont deze toch gelijkenissen met de door ons ontwikkelde methode. Een groot verschil en tevens voordeel van de door ons ontwikkelde “sample stacking” is dat deze volledig *on line* werd uitgevoerd, in tegenstelling tot de

“stacking”-procedure van Schrader en Linscheid die *off line* uitgevoerd wordt. Dit door het capillairuiteinde tijdens de “stacking” uit de probe te halen en onder te dompelen in een buffervaatje. De “sample stacking”-procedure heeft het voordeel op CITP-gebaseerde methoden dat uitgevoerd kan worden met dezelfde buffers als een conventionele CZE-scheiding en dat dus vluchtige buffers gebruikt kunnen worden. De concentratiefactor van deze techniek is gelijkwaardig aan die van de CITP-methoden (en bedraagt dus eveneens een factor 100) (Chien en Burgi, 1992).

III.1.5. Quadrupool massaspectrometrie in vergelijking met TOF MS in combinatie met CZE-ES

Een van de belangrijkste problemen bij het gebruik van MS-detectie in combinatie met CZE is dat CZE in sommige gevallen aanleiding kan geven tot piekbreedtes van slechts 1 seconde of minder (Banks, 1997). Het overgrote deel van de massaspectrometers zijn quadrupool toestellen (en in mindere mate ook magnetische-sectortoestellen) die gebaseerd zijn op het variëren van een elektrisch en/of magnetisch veld teneinde de ionen over de geselecteerde m/z -range te detecteren. Hieruit volgt dat dergelijke toestellen 1 tot 20 sec. nodig hebben om het geselecteerde m/z -gebied af te scannen. Gezien het wenselijk is om per piek toch een vijftal scans te collecteren betekent dit dat de piekbreedte toch minstens in de grootteorde van een tiental seconden dient te liggen. Een gedeeltelijke oplossing voor dit probleem werd gevonden met de “verminderde elutiesnelheid”-techniek (VES) (Smith et al., 1993), waarbij het CZE-voltage verlaagd wordt wanneer de componenten de capillairtip bereiken en bijgevolg de pieken breder worden. Op die manier kunnen meer scans per piek opgenomen worden maar gaat natuurlijk ook een deel van de scheidingsefficiëntie verloren.

De “time-of-flight” (TOF) massaspectrometer daarentegen is in staat om heel snel m/z -data op te nemen, dit doordat hij niet scant. Massadetectie in een TOF-toestel is gebaseerd op het verschil in vluchttijden van ionen die van een bron samen vertrekken en bij de detector aankomen in volgorde van hun m/z -waarde.

Omdat deze vluchttijden heel kort zijn en geen variërende elektrische of magnetische velden vereisen kunnen volledige massaspectra bekomen worden aan snelheden van 10 tot 20 kHz (Banks, 1997). Deze spectra worden dan gesommeerd over tijdsintervallen die geschikt zijn voor de piekbreedtes relevant voor de gebruikte scheidingstechniek.

Een dergelijk TOF-instrument heeft ook een veel betere gevoeligheid dan een quadrapool toestel, omdat het grootste deel van de ionen die in het vacuümsysteem belanden ook de detector bereiken. Bij scanningtoestellen (zoals quadrapolen en magnetische-sectoren) gaan een groot deel van de ionen intentioneel verloren, ten gevolge van het veranderende elektrisch/magnetische veld nodig om het ion-traject van een bepaalde m/z -waarde te selecteren voor zijn detectie. Met een CZE-ES-TOF-opstelling kan een proteïnescheiding met piekbreedtes van 1 tot 2 seconden feilloos gedetecteerd worden en dit met een gevoeligheid van 8 fmol, geïnjecteerd op het capillair (Banks en Dresch, 1996).

De combinatie van CZE-ES met TOF-massaspectrometers blijkt dan ook een ideaal huwelijk te worden, waarbij de scheidingsefficiëntie van CZE ten volle benut kan worden in combinatie met een hoge gevoeligheid.

III.2. Inleiding

Het hoofddoel van dit onderdeel van het onderzoek bestond erin om na te gaan of de in het vorige hoofdstuk op punt gestelde CZE-scheiding op een efficiënte wijze gekoppeld kon worden aan massaspectrometrische detectie via een elektrospRAY-ionisatie-interface. Hier werden de kritische parameters van de CZE-ES-MS koppeling geëvalueerd en geoptimaliseerd. Bij de aanvang van dit onderzoek stond de CZE-ES-MS koppeling nog in zijn kinderschoenen, en was één van de belangrijkste problemen hierbij de beperkte hoeveelheid staal die op het CZE-capillair kon geïnjecteerd worden. Dit leidde tot een gevoeligheidsprobleem bij koppeling met ES-MS.

In dit onderzoek werd voor het eerst de “sample stacking”-techniek, die geoptimaliseerd werd in het vorige hoofdstuk, *on-line* toe gepast in combinatie met ES-MS. Dankzij deze “sample stacking” werd de gevoeligheid van de CZE-ES-MS techniek met een factor honderd verhoogd. Deze winst in gevoeligheid opende de weg naar identificatie met behulp van CZE-ES-MS/MS van DNA-adducten, wat één van de uiteindelijke doelstellingen was van dit doctoraatswerk.

Het leeuwendeel van het CZE-ES-MS en CZE-ES-MS/MS werk werd uitgevoerd op een “triple-quadrupool”-instrument, wat bij de aanvang van dit werk het toestel bij uitstek was voor structurele opheldering van DNA-adducten in combinatie met CZE-ES. Naar het einde van dit onderzoekswerk werd “Time-of-flight”-massaspectrometrie dankzij de ontwikkeling van ES-QTOF beschikbaar voor koppeling aan CZE. Zoals reeds eerder besproken is CZE-ES-TOF een ideaal huwelijk. Niet alleen de inherent hogere gevoeligheid van de TOF-detector ten opzichte van de quadrupole detector is een belangrijke troef naar koppeling met CZE, maar zoniet nog belangrijker is de mogelijkheid om pieken met piekbreedtes van 1 tot 2 seconden feilloos te detecteren (Banks en Dresch, 1996). Dit laat toe de scheidingsefficiëntie van CZE ten volle te benutten. In dit hoofdstuk werden beide massaspectrometrische technieken geëvalueerd.

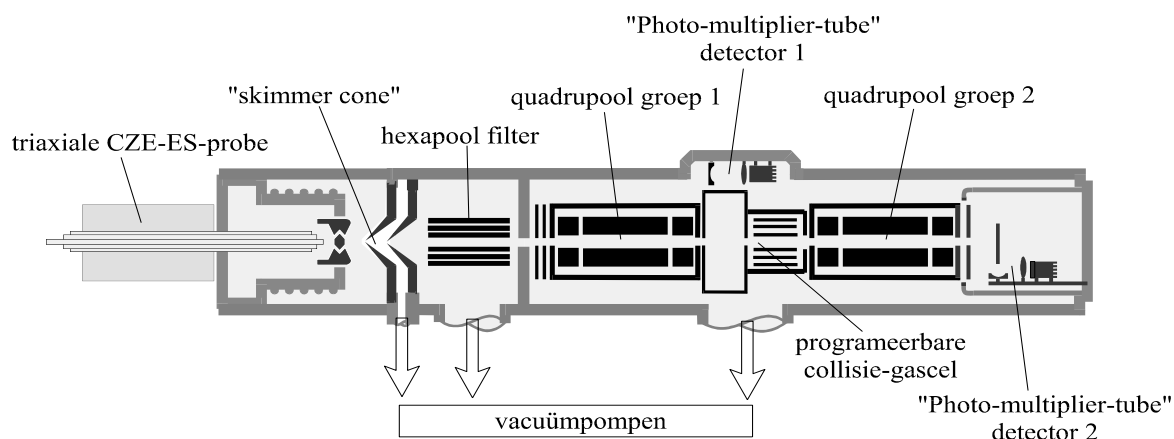
III.3. Materiaal en methoden

III.3.1. Chemicaliën

2'-Deoxyadenosine-5'-monofosfaat (dAMP) was van Janssen Chimica (Beerse). Thymidine-5'-monofosfaat (TMP), methanol, isopropanol, ammoniumcarbonaat en broomfenolblauw waren van Sigma (St. Louis, MO, VS). (±)-2,3-epoxypropylfenylether (PGE) was van Aldrich (Steinheim, Duitsland). HPLC-water werd bekomen door zuivering van gedesoniseerd water met het Milli-Q Reagent Grade waterzuiveringssysteem (Millipore, Bedford, MA, VS). Dit HPLC-water voldoet ruim aan alle ISO3696/BS3978 standaarden voor graad-I-zuiverheid en bezit een weerstand van 18.2 MΩ.cm. Alle gebruikte chemicaliën waren van *pro analysi* kwaliteit.

III.3.2. Elektrospray-quadrupool massaspectrometer

De "triple-quadrupool"-massaspectrometer (type "VG Quattro II triple-quadrupole") was van Micromass (Manchester, Engeland). Zoals blijkt uit figuur 3.3 is dit toestel opgebouwd uit twee opeenvolgende quadrupool massaspectrometers. Dit maakt het mogelijk om naast enkelvoudige-MS-experimenten, waarvoor enkel gebruik wordt gemaakt van de eerste quadrupool groep en de eerste detector, ook tandem-MS-experimenten (MS/MS) uit te voeren.



Wanneer de ionisatie, zoals in onze experimenten gebaseerd is op elektropray, wordt enkelvoudige-MS (ES-MS) toegepast om het moleculair gewicht van de componenten te bepalen. Daar elektropray een zachte ionisatietechniek is blijven het overgrote deel van de ionen intact en treed er weinig tot geen fragmentatie op van de moederionen. Met als gevolg dat een ES-MS experiment niet meer structuurinformatie verschaft dan het moleculair gewicht.

Bij ES-MS experimenten scant de eerste quadropool groep een geselecteerd massagebied af, bij onze experimenten werd een gebied tussen 160 Da en 800 Da bekeken, aan een bepaalde scansnelheid, die voor onze experimenten 320 Da/sec. bedroeg. Dit betekent dat de massaspectrometer twee seconden nodig heeft om het massagebied dat ons interesseerde (160 tot 800 Da) volledig te overlopen.

Teneinde meer structurele informatie te bekomen in combinatie met elektropray kunnen productionenspectra opgenomen worden (ES-MS/MS). Daarbij wordt de eerste quadropool groep (figuur 3.3) gebruikt om een gewenst moederion te selecteren. Dit moederion wordt vervolgens in de botsingsgascel gefragmenteerd. Deze fragmentatie wordt bewerkstelligd door het moederion met een zekere energie (in onze experimenten bedroeg die afhankelijk van het product 15 tot 35 eV) te laten botsen met een edelgas in de gascel (in onze experimenten was dit Argon, 3×10^{-3} mbar). Daarbij valt het moederion uiteen in een geladen fragmention en in één of meerdere neutrale fragmenten. De massa van de geladen fragmentionen wordt bepaald door de tweede quadropool groep die scant over een relevant massagebied wat resulteert in het productionenspectrum. Deze techniek wordt collisioneel-geïnduceerde-dissociatie (CID) genaamd, en werd in dit werk gebruikt om de structuur van de DNA-adducten te bepalen.

III.3.3. CZE-ES-koppeling

Teneinde het CZE-systeem *on line* te koppelen aan de quadropool massaspectrometer via elektropray, werd als CZE-capillair gebruikgemaakt van een silica-capillair met een lengte van 1.10 m (i.d. 75 μm en u.d. 365 μm), dat in de triaxiale CZE-ES-probe (Micromass, Manchester, Engeland) werd aangebracht. Gezien de fysische belemmering van de behuizing van het CZE-toestel en de

triaxiale ES-probe kon het capillair niet korter gemaakt worden. Het CZE-capillair werd zo gepositioneerd dat het aan de tip van de ES-probe 200 μm voorbij het stalen “sheath”-vloeistofcapillair stak. Dit capillair stak op zijn beurt 500 μm voorbij het stalen capillair dat het vernevelingsgas aanbracht. Het vloeistofniveau in het anodereservoir (aan de injectie zijde van het capillair) werd op gelijke hoogte gebracht als de tip van de ES-probe wanneer deze gepositioneerd was in de bron van de massaspectrometer. Dit is noodzakelijk om hydrodynamische effecten te vermijden tijdens de elektroforese, staalinjectie en “sample stacking”.

De “sheath”-vloeistof werd met behulp van een HPLC- pomp aan de ES-tip geleverd aan een debiet van 7 $\mu\text{l}/\text{min}$. Om een dergelijk laag debiet voldoende reproduceerbaar te kunnen pompen werd gebruikgemaakt van een “splitter”. Deze splitst het vloeistofdebiet met een factor van 1 over 20 van het aangeboden debiet (140 $\mu\text{l}/\text{min}$), naar het afgegeven debiet (7 $\mu\text{l}/\text{min}$). Deze “sheath”-vloeistof is zoals reeds besproken noodzakelijk voor het bekomen van een elektrisch contact aan het capillair uiteinde, dankzij de aanwezigheid van een kleine hoeveelheid elektrolyt (geoptimaliseerd op 0.5 mM ammoniumcarbonaat). Gelijktijdig zorgt hij er ook voor dat de vloeistof de gewenste eigenschappen krijgt, nodig voor het elektroprayproces, zijnde een lage oppervlaktespanning (geoptimaliseerd door het toevoegen van 80% isopropanol) en een lagere elektrische geleiding. Zonder deze “sheath”-vloeistof zou de door ons gebruikte CZE-buffer geen elektropray vormen, gezien deze geen organische solventen bevat en dat vloeistoffen met een hoog watergehalte niet goed combineerbaar zijn met elektropray door hun te hoge oppervlaktespanning (Edmonds et al., 1989). Tevens bevat dit buffersysteem te veel elektrolyten (100 mM ammoniumcarbonaat), waardoor zijn geleiding te hoog zou zijn en de ionisatie van de componenten onderdrukt zou worden (Smith et al., 1993), om als dusdanig bruikbaar te zijn bij ES.

Het debiet van het stikstof-drooggas werd geoptimaliseerd tussen 50 en 100 l/uur, de functie van dit gas is de bron en de gevormde elektropray drogen zodat de druppels gevormd aan de “Taylor cone” voldoende snel kunnen evaporeren. Het debiet van het stikstof-vernevelingsgas werd geoptimaliseerd bij 30 l/uur. De functie van dit gas is de vorming van de elektropray aan het capillairuiteinde bevorderen,

door de vloeistof gedeeltelijk te vernevelen.

Negatieve elektroprayionisatie werd bekomen door een spanning van -4.5 kV aan te brengen op het “sheath”-vloeistofcapillair. Op de counterelektrode voor het elektroprayproces, zijnde de “skimmer cone” werd een spanning van + 30 V aangelegd. De spanning van ongeveer +30 V op de “skimmer cone”, die de ingang vormt voor het vacuümgedeelte van de massaspectrometer, is essentieel van die grootteorde en polariteit (ook voor +ES) en kan weinig gevarieerd worden (Banks, 1997). Het spanningsverschil tussen het capillairuiteinde en de “skimmer cone” zorgt ervoor dat de negatieve ionen naar de “skimmer cone” toe worden gezogen en zo in de massaspectrometer terecht komen.

De temperatuur in de bron werd constant gehouden op 75°C, deze lichtjes verhoogde temperatuur bevordert het elektroprayproces door het verlagen van de viscositeit en de oppervlaktespanning van de vloeistof ter hoogte van de “Taylor cone” en bevordert eveneens het evaporatieproces van de gevormde druppels wat leidt tot de reeds besproken cascade van desintegraties van deze druppels.

Elektroforese werd uitgevoerd door een spanning van 13 kV aan te brengen op het capillair, wat resulteert in een totaal spanningsverschil over het capillair van 17.5 kV. Tijdens de elektroforese werd een druk van 10 mbar aangelegd over het capillair teneinde de analysetijden te verkorten.

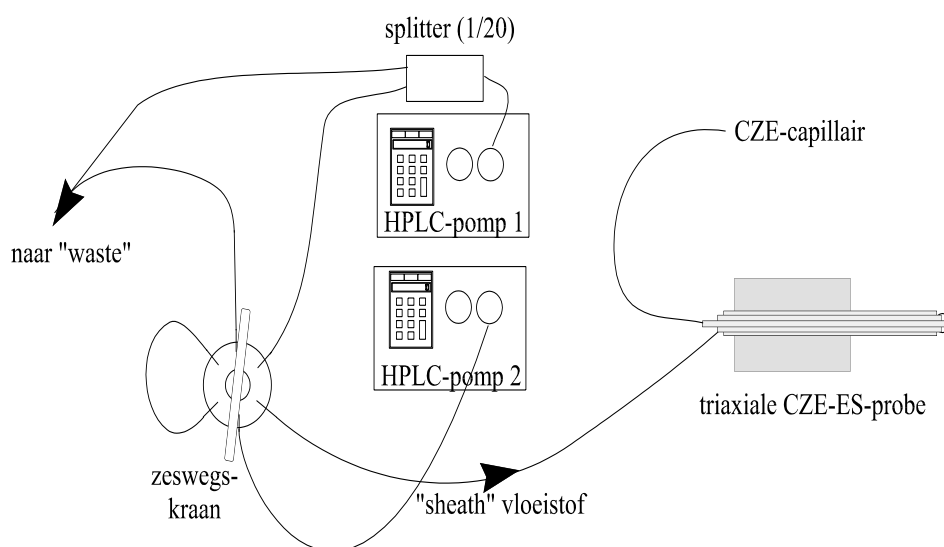
III.3.4. On-line CZE-ES-MS “sample stacking”

Ten einde de “sample stacking”-procedure, analoog zoals beschreven voor *off line* CZE in Hoofdstuk II, te kunnen gebruiken in combinatie met ES-MS moet aan twee voorwaarden voldaan worden: de stroom die door het capillair vloeit tijdens het “sample stacking”-proces moet gevolgd kunnen worden ten einde het eindpunt van het proces te kunnen determineren. Een tweede, zo niet moeilijker op te lossen probleem is de afwezigheid van een buffervaatje aan het uiteinde van het capillair.

Normaliter wordt de stroom gemeten die vloeit tussen de kathode en de anode, gezien bij de *on-line* koppeling de elektrode aan het capillairuiteinde niet in verbinding staat met het CZE-toestel valt deze mogelijkheid weg. Gelukkig laat het

CZE-toestel ook toe om de stroom te volgen die wegvloeit uit de hoogspanningsbron om zo het verloop van de “sample stacking”-procedure te volgen.

Tijdens de “sample stacking” verloopt de EOF in tegenovergestelde richting dan tijdens normale elektroforese en veroorzaakt dus een vloeistofstroom die gericht is van de capillairtip naar de injectiezijde toe. Waardoor vloeistof aan het capillairuiteinde in het capillair wordt gezogen. Dit impliceert dat, teneinde de “sample stacking” en de daaropvolgende elektroforese niet te verstoren, aan het capillairuiteinde de CZE-buffer beschikbaar moet zijn. We observeerden dat wanneer de vernevelingsgasstroom afgezet werd zich een druppel vormde van “sheath”-vloeistof over het capillairuiteinde waarvan aangenomen werd dat de hoeveelheid vloeistof die daardoor beschikbaar werd voldoende zou zijn om de “sample stacking” uit te voeren. Om CZE-buffer beschikbaar te stellen aan de probe-tip werd een tweede “sheath flow”-systeem ontwikkeld. Met een tweede HPLC-pomp werd het CZE-buffersysteem (100 mM ammonium carbonaat pH 9.68) aan een vloeistofdebiet van 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ aan de probe-tip geleverd. Dit debiet volstaat om de EOF buffer in het capillair te laten zuigen zonder dat daarbij luchtbellens geïntroduceerd worden. Beide “sheath flow” systemen werden gekoppeld aan het “sheath”-vloeistofcapillair met behulp van een “Valco”-zeswegskraan (zie figuur 3.4).



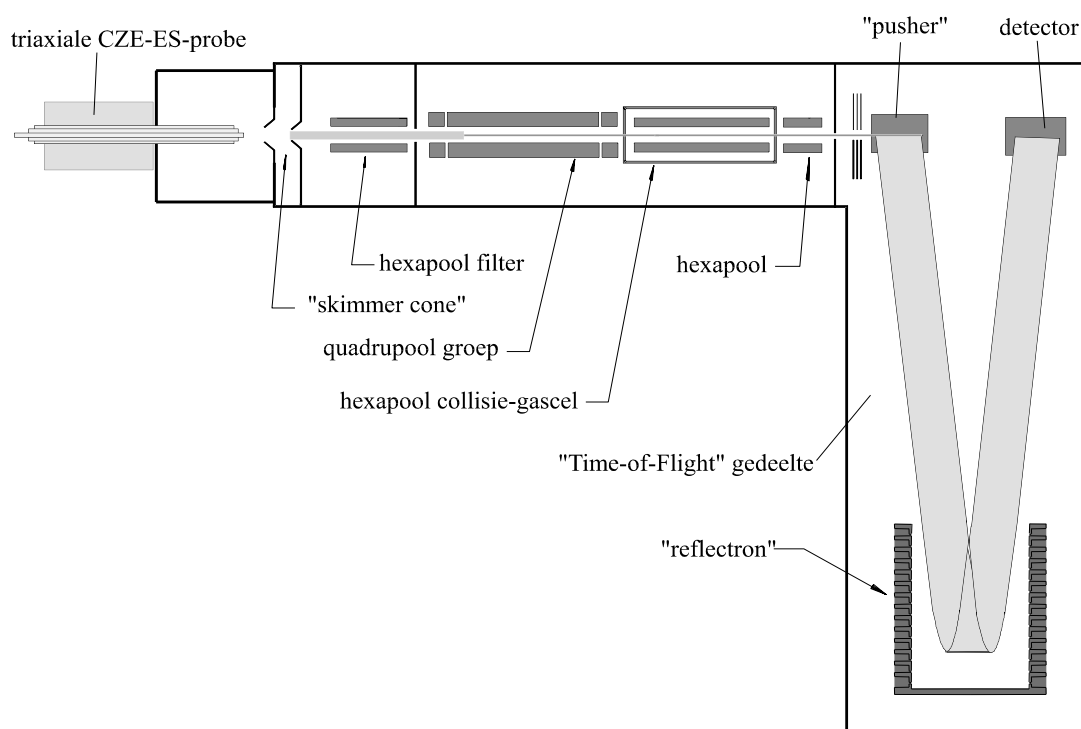
Door gebruik te maken van deze opstelling kan de “sample-stacking” uitgevoerd worden *on line*, zonder probe of capillair uit de bron te verwijderen. Dit biedt een aantal grote voordelen ten opzichte van technieken waarbij het capillair of de probe uit de bron verwijderd dienen te worden om het capillairuiteinde onder te dompelen in een buffervaatje (Schrader en Linscheid, 1995). Een eerste voor de hand liggend voordeel is dat de probe altijd correct gepositioneerd blijft. De efficiëntie van het CZE-ES-sprayproces is namelijk heel sterk afhankelijk van de positionering van de probe in de bron. Wij ondervonden dat een afwijking van de ideale positie met slechts onderdelen van een millimeter de gevoeligheid met een factor tien kan verminderen. Een bijkomend probleem bij de *off-line* methode is dat de geconcentreerde staalzone uit het capillair zou kunnen vloeien tijdens manipulatie van de probe of het capillair. Bovendien laat enkel een *on-line* methode verdere ontwikkeling naar automatisatie van het “sample-stacking”-systeem toe, wat de techniek interessant maakt voor heel wat meer toepassingen. In zijn hier beschreven concept is automatisatie niet mogelijk gezien het gebruik van een manuele zeswegskraan.

Vooraleer de “sample stacking” werd gestart, werd de stroom gemeten die gegenereerd werd bij het aanleggen van een spanning van -9 kV. Deze stroom bedroeg tussen de -48 en -54 μA en wordt de stack-limietstroom geheten. Vervolgens werd de zeswegskraan omgeschakeld zodat nu de CZE-buffer via de tweede HPLC-pomp naar de probetip werd gepompt. Wanneer deze de probetip bereikte viel de elektro spray ionisatie-efficiëntie drastisch terug, wat het signaal was om de “sample stacking” te starten. Een staalplug van de gewenste lengte werd geïnjecteerd door het aanleggen van een druk aan de injectiezijde (bvb. 100 mbar, 0.2 min.). Tijdens de injectie werden de spanning en de gasstromen in de bron afgezet. Daarna werd een spanning van -9 kV aangelegd aan de inlaatzijde en werd de spanning aan de probetip terug aangelegd (-4.5 kV), wat resulteert in een spanningsverschil van -4.5 kV. Tijdens dit proces worden de negatief geladen staal componenten geconcentreerd zoals beschreven in Hoofdstuk II. Wanneer de stroom (die initieel zo’n -15 μA bedroeg) de stack-limietstroom vermeerderd met 0.5 μA bereikte, werd de normale elektroforese gestart. De gassen in de bron werden terug aangezet en de zeswegskraan werd terug omgeschakeld naar het elektro spray

“sheath”-solvent.

III.3.5. Elektrospray-QTOF massaspectrometer

De quadropool-“Time-of-Flight”-massaspectrometer (QTOF) (type “Q-TOF™”) was van Micromass (Manchester, Engeland). Zoals blijkt uit figuur 3.5 is het eerste gedeelte van dit toestel een quadropool groep, het tweede gedeelte is een TOF-massaspectrometer. De TOF-massaspectrometer bevat een zogenaamde “reflectron”, die de ionen reflecteert waardoor hun effectieve vluchtpad verlengd wordt en de resolutie en accuraatheid van de massabepaling verbeterd wordt (Roepstorff, 1997). Naar analogie met de “triple-quadropool”-massaspectrometer kunnen ook met dit toestel zowel enkelvoudige-MS- als tandem-MS-experimenten uitgevoerd worden. Ook hier is de ionenbron de triaxiale CZE-ES-probe en is het ionisatieprincipe dus elektrospray.



Bij enkelvoudige-MS-experimenten fungeert de quadropool groep als

ionenbrug en passeren alle ionen door dit eerste gedeelte. De eigenlijke massabepaling gebeurt in het TOF-gedeelte, daarbij geeft de “pusher” het startsignaal en de impuls voor de vlucht van de ionen. De voordelen van de massabepaling met een TOF-instrument, in vergelijking met een quadrapool-instrument, werden reeds besproken in Hoofdstuk III.1.5.

Voor het opnemen van productionenspectra wordt, in analogie met het “triple-quadrapool”-toestel, de quadrapool groep (figuur 3.5) gebruikt om een gewenst moederion te selecteren. Dit moederion wordt vervolgens in de botsingsgascel gefragmenteerd en de massa van daarbij gevormde geladen fragmenten wordt bepaald in het TOF-gedeelte, met de hiervoor vermelde voordelen.

III.4. Resultaten en bespreking

III.4.1. Optimalisatie van de spray en tuning van het ES-MS toestel

In eerste instantie werd de stabiliteit en de efficiëntie van de spray *off line* visueel geëvalueerd met behulp van een stereomicroscoop. Teneinde de verschillende parameters, die elkaar onderling ook beïnvloeden, te kunnen evalueren werd in eerste instantie geen elektroforese uitgevoerd maar werd door het CZE-capillair een vloeistofstroom opgewekt door het aanbrengen van een drukverschil van 10 mbar. Verder werden een “sheath flow” van 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, een vernevelingsgasdebiet van 30 l/u en een elektrospayspanning van -4 kV aangewend.

De onderlinge afstanden van de drie capillairen aan de punt van de ES-probe bleken van primordiaal belang voor de vorming van een elektropray. Het CZE-capillair gaf op een afstand van 200 μm voorbij het stalen “sheath”-capillair aanleiding tot een stabiele fijne spray. Wanneer het capillair verder of minder ver werd gepositioneerd werd de spray onstabiel (sputtering) en werden grote druppels gevormd aan de ES-probe. De spray vertoonde een optimale stabiliteit wanneer het stalen “sheath”-capillair zich op een afstand van 500 μm voorbij het stalen capillair bevond dat het vernevelingsgas aanbood. Beide afstanden zijn cruciaal voor de vorming van een stabiele spray en deze parameter dient dus zorgvuldig geoptimaliseerd te worden. Verder is het eveneens belangrijk dat alle capillairen concentrisch zijn en dat ze elkaar op geen enkele plaats raken, wat leidt tot een onmiddellijk wegvallen van de spray.

Hoe lager het debiet van de “sheath”-vloeistof gehouden kan worden, hoe gevoeliger de ES-MS-detectie wordt (Banks, 1997), daarom werd nagegaan hoe laag dit debiet kon zijn zonder dat de spray onstabiel werd of dat het elektrischcontact aan de tip verbroken werd. Een debiet van 7 $\mu\text{l}/\text{min}$ bleek net aan die eisen te voldoen. Met een lager debiet was de vloeistoftoevoer onvoldoende om een constant elektrisch contact te verzekeren.

De overige parameters werden geoptimaliseerd *on line*, dit betekent onder de

omstandigheden zoals de analyses uitgevoerd zouden worden. Daartoe werd door het capillair constant een verdunning van dAMP/TMP (0.1 mg/ml) in 0.1 M elektroforese buffer (ammoniumcarbonaat pH 9.68) aangeboden door het aanbrengen van een druk van 10 mbar en spanning van 10 kV over het capillair. De triaxiale-probe werd gepositioneerd in de bron en de signaal sterkte bekomen voor dAMP en TMP werd gevolgd. De positionering van de triaxiale-probe in de bron (zowel X, Y als Z richting) dient zorgvuldig geoptimaliseerd te worden. De signaalsterkte was optimaal wanneer de ES-spanning ingesteld werd op -4.5 kV en de spanning op de “cone” op +30 V. Een hogere spanning op de “cone” gaf aanleiding tot fragmentatie van de componenten doordat deze te veel inwendige energie kregen toegevoegd.

De elektroforesespanning die aangewend werd beïnvloedde ook de signaalintensiteit. Deze was optimaal bij een spanning van 13 kV, dit betekent dat over het capillair een spanningsverschil van 17.5 kV heerst. Wanneer de elektroforesespanning werd opgedreven gaf dit aanleiding tot een sterke instabiliteit van het signaal wat toegewezen werd aan elektrostatische-ontladingen aan de capillairtip, deze vonken konden waargenomen worden wanneer de probe uit de bron werd gehaald.

Het bleek noodzakelijk om de poly-imidecoating over de gehele lengte van het capillair dat zich in de triaxiale-probe bevond te verwijderen. Deze kwam los van het silicacapillair, waarschijnlijk onder invloed van de ammoniumcarbonaat in de “sheath”-vloeistof en veroorzaakte obstructies van de “sheath”-stroom en van de “cone” wat aanleiding gaf tot sterk signaalverlies.

Voor alle verdere analyses werden de volgende geoptimaliseerde condities gebruikt: een “sheath”-vloeistofdebiet van 7 $\mu\text{l}/\text{min}$, elektrospayspanning van -4.5 kV op het “sheath”-vloeistofcapillair, een spanning van +30 V op de “skimmer cone” en een elektroforesespanning van 13 kV (zoals ook weergegeven in Hoofdstuk III.3.3).

III.4.2. Optimalisatie van de “sheath”-vloeistofsamenstelling

Vijf verschillende samenstellingen van de “sheath”-vloeistof werden geëvalueerd op hun performantie gedurende CZE-ES-MS (condities zie Hoofdstuk

III.3.3): (A) 50/50 methanol/0.01 M ammoniumcarbonaat (pH 9.68), (B) 50/50 isopropanol/0.01 M ammoniumcarbonaat (pH 9.68), (C) 80/20 isopropanol/0.01M ammoniumcarbonaat (pH 9.68), (D) 80/20 isopropanol/2.5 mM ammoniumcarbonaat (pH 9.68) en (E) 80/20 isopropanol/HPLC-water. Gebruikmakend van de laatste samenstelling werd geen stabiele stroom bekomen gedurende de elektroforese. Deze “sheath”-vloeistof werd dan ook niet verder geëvalueerd. De aanwezigheid van ammoniumcarbonaat in de “sheath”-vloeistof was noodzakelijk om voldoende elektrisch contact te bekomen aan de probe-tip. Hun invloed op de efficiëntie van de ionisatie in -ES werd geëvalueerd door het reactiemengsel van dAMP met PGE (bereid zoals beschreven in Hoofdstuk II.3.2) te analyseren, onder “full scan”-condities (160 - 800 Da, aan een scansnelheid van 320 Da/sec.). Injectie werd uitgevoerd door het aanleggen van een druk van 40 mbar gedurende 30 sec.

Wanneer de samenstelling van de “sheath”-vloeistof veranderd wordt van A naar B, dan neemt de gevoeligheid toe met gemiddeld een factor van 4.6 (zie tabel 3.1). Deze bevinding bevestigt de algemene ervaring dat isopropanol betere resultaten geeft dan methanol onder negatieve elektropray omstandigheden. Gebruik van “sheath”-vloeistof C veroorzaakt een additionele verhoging van de signaalintensiteit met een factor 1.8 in vergelijking met samenstelling B. Het gebruik van meer isopropanol verbetert de verdamping, de druppelvorming en de druppeldesintegratie in de spray (dankzij het lager kookpunt (82.5°C) van isopropanol en zijn lagere oppervlaktespanning dan water).

TABEL 3.1: Invloed van de samenstelling van de “sheath”-vloeistof op de oppervlakten onder de curve voor de producten aanwezig in het reactiemengsel van dAMP met PGE.

m/z	“sheath”-solvent samenstelling			
	A	B	C	D
630*	256	814	1354	1406

480 [*]	1652	8392	15709	15108
480 [*]	1729	9557	17871	17985
330 [*]	3367	15604	32120	32325

* De m/z waarde van 630 stemt overeen met het gedialkyleerde adduct van dAMP, beide producten bij m/z 480 zijn monogealkyleerde adducten van dAMP en het product bij m/z 330 stemt overeen met het ongewijzigde dAMP.

Na een viertal uur gebruik van het vloeistofstelsysteem C begon de gevoeligheid echter te dalen en werd de elektroforese meer en meer verstoord. Een verklaring werd gevonden in de afzetting van kleine zoutkristallen aan de elektrospaytip. Dit probleem werd opgelost door het gebruik van “sheath”-vloeistof D. Deze geeft een zelfde signaalintensiteit als vloeistofstelsysteem C, maar gezien zijn lagere zoutconcentratie treedt geen kristalvorming meer op.

III.4.3. Optimalisatie van de staalinjectie

Teneinde te evalueren of de vernevelingsgasstroom of het debiet van het drogingsgas een hydrodynamische invloed hebben op de vloeistof aanwezig in het capillair werd aan de injectiezijde van het capillair de poly-imidecoating over een afstand van 7 cm verwijderd. Vervolgens werd het capillair voor 3.5 cm gevuld met een sterk gekleurde broomfenolblauw- oplossing. Een hydrodynamische vloeistofstroom werd slechts waargenomen wanneer het debiet van het vernevelingsgas excessief hoog werd gezet (dit debiet viel buiten het meetbereik), een debiet zoals normaal aangewend van 30 l/u had totaal geen invloed op de hydrodynamische vloeistofstroom. Hetzelfde experiment werd ook uitgevoerd voor het drogingsgas. Ook hier werd slechts een invloed waargenomen bij een excessief hoog debiet (>400 l/u), het normale debiet van 100 l/u had geen invloed.

Er werd eveneens geëvalueerd wat de invloed was van de elektrospayspanning (-4.5 kV) op de staalinjectie. Daartoe werd een oplossing van dAMP/TMP in HPLC-water (1mg/ml) geïnjecteerd in het capillair (22 mbar, 0.2 min).

Bij tien injecties werd de elektrospayspanning aangelaten en bij tien volgende injecties werd ze afgezet tijdens de injectie. Na de injectie werd de geïnjecteerde plug door het capillair naar de ES-bron gedreven door het aanleggen van een spanning van 13 kV en een druk van 150 mbar en gedetecteerd in “full scan”-MS modus. De injecties, met de elektrospayspanning aan tijdens de injectie, gaven geen signaal. De tien injecties met de spanning af tijdens de injectie vertoonden een sterke intensiteit voor de geïnjecteerde componenten. De verklaring voor dit fenomeen is dat de negatieve spanning op het capillairuiteinde tijdens de injectie de negatief geladen staalcomponenten elektrostatisch afstoot, waardoor deze componenten niet op het capillair geïnjecteerd worden. Het is dus noodzakelijk om tijdens de staalinjectie de elektrospayspanning af te zetten.

III.4.4. Optimalisatie van de elektroforese

Gezien het capillair in de CZE-ES-MS-opstelling een totale lengte heeft van 110 cm, wat ongeveer 20% langer is dan de opstelling bij *off-line* CZE en dat de aangelegde spanning in beide gevallen geoptimaliseerd werd bij ongeveer 17 kV is het vanzelfsprekend dat het elektrischveld verantwoordelijk voor de elektroforese in de CZE-ES-MS-opstelling lager zal zijn (159 V/cm) dan bij *off-line* CZE (185 V/cm). Rekening houdende met het feit dat de detectie bij *off-line* CZE gebeurt op een afstand van 62 cm en bij CZE-ES-MS op het einde van het capillair (zijnde 110 cm) kan met behulp van formule 1 (Hoofdstuk II) berekend worden dat de migratietijden in CZE-ES-MS een factor 2.1 langer zullen zijn dan bij *off-line* CZE.

(1)Fout!

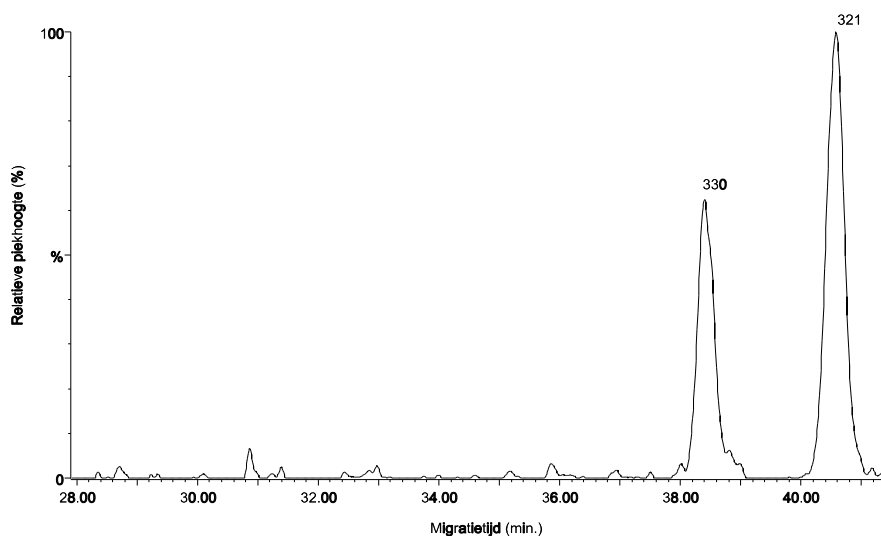
De migratietijden bedroegen voor sommige componenten tot 30 minuten in de *off-line* CZE-experimenten, dit impliceerde dat de analyses met CZE-ES-MS onder de voorliggende omstandigheden tot 1 uur per analyse zouden in beslag nemen. Teneinde de analysetijd te verkorten werd geopteerd om tijdens de elektroforese een kleine additionele druk van 10 mbar aan te brengen over het capillair. Dit bleek de eenvoudigste oplossing, daar het capillair niet kon ingekort worden door de beperking van de behuizing van de toestellen. Ook de spanning kon niet opgedreven worden daar dit aanleiding gaf tot een instabiele elektro spray.

Ten gevolge van het aanbrengen van een hydrodynamische vloeistofstroom over het capillair wordt natuurlijk een deel van de efficiëntie van de scheiding opgeofferd. Doordat een hyperbolisch vloeiprofiel ontstaat (zoals dit het geval is in HPLC-scheidingen) in tegenstelling met het vlakke vloeiprofiel dat veroorzaakt wordt door de EOF.

De migratietijden bekomen voor de analyse van een standaard dAMP/TMP oplossing (2.9×10^{-4} M) onder de beschreven CZE-ES-MS “full scan”-condities (zie Hoofdstuk III.3.2 en III.3.3), met het aanbrengen van 10 mbar druk tijdens de elektroforese (13 kV), (normale injectie: 20 mbar gedurende 0.2 min) bedroegen 38.41 min. voor dAMP en 40.57 min (zie figuur 3.6) voor TMP. Dit zijn aanvaardbare analysetijden. Het aantal theoretische platen (N) van die analyse bedroeg gemiddeld 80.000. Dit is beduidend minder dan de efficiëntie bekomen voor de *off-line* CZE-scheiding (200.000). Dit verlies in efficiëntie van de scheiding wordt echter ruimschoots gecompenseerd door de hogere selectiviteit van de massadetectie ten opzichte van de UV-detector. De resolutie voor dAMP en TMP bedroeg gemiddeld 4.0.

Deze daling in efficiëntie van de scheiding waardoor piekverbreding ontstaat, kan voordelig zijn bij het uitvoeren van CZE-ES-MS met quadrapool instrumentatie gezien dan per piek meerdere scans uitgevoerd kunnen worden (Smith et al., 1993).

Voor alle verdere analyses werd tijdens de elektroforese (13 kV) een druk van 10 mbar aangelegd over het capillair, teneinde aanvaardbare analysetijden te bekomen.



III.4.5. Gevoeligheid en lineariteit van de detectie

De lineariteit en de detectielimieten van de CZE-ES-MS-methode werden bepaald door verdunningen van een standaardoplossing van dAMP/TMP (1mg/ml in HPLC-water) te analyseren onder de geoptimaliseerde condities (Hoofdstuk III.3.3). Alle verdunningen werden geïnjecteerd door het aanbrengen van een druk van 20 mbar gedurende 0.2 min. Met behulp van de formules 11 tot 13 (Hoofdstuk II) werd de geïnjecteerde hoeveelheid berekend.

(11) **Fout!**

(12) **Fout!**

(13) $H_i = V_p 10^6 C$

Wanneer de lineariteit van het signaal bekomen onder “full scan”-condities (een m/z gebied van 160 -8700 Da werd gescand aan een snelheid van 320 Da/sec) bestudeerd wordt (zie figuur 3.7), blijkt dat de respons in een vrij goed verband staat met de geïnjecteerde hoeveelheid. De correlatiecoëfficiënt r, bekomen na lineaire regressieanalyse, bedraagt gemiddeld voor de twee componenten 0.9980, over een injectie-interval van 0.5 tot 50 pmol.

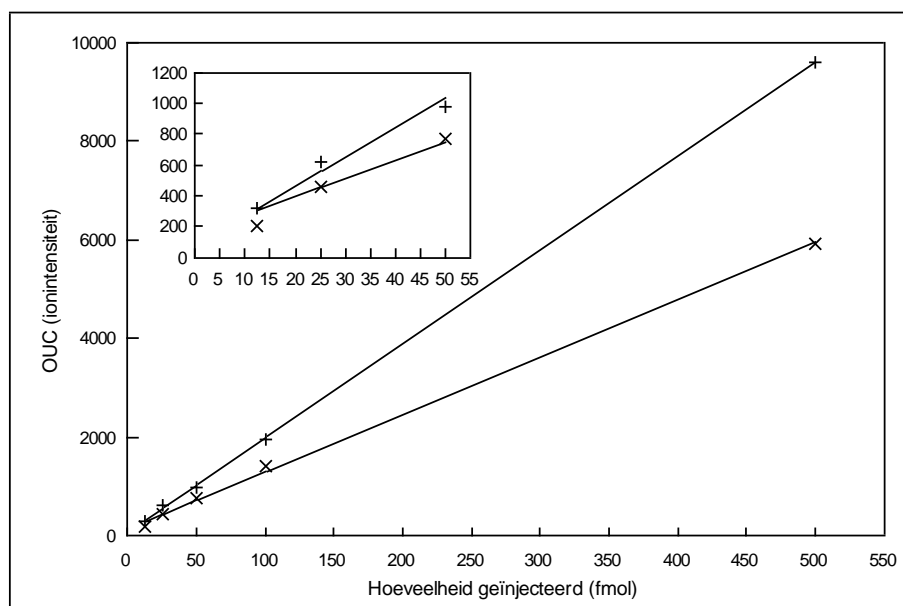
De detectielimiet bekomen onder “full scan”-condities bedraagt 500 fmol, wat bij normale injectie overeenstemt met injectie van een staal met een concentratie van 2.9×10^{-5} M (zie tabel 3.2). Deze gevoeligheid is nagenoeg identiek aan de gevoeligheid die bekomen wordt gebruikmakend van UV-detectie.

TABEL 3.2: Detectielimieten bekomen voor de CZE-ES-MS en CZE-ES-MS/MS-analyse (condities Hoofdstuk III.3.3) van de verdunningen van een mengsel van dAMP en TMP.

	ΔP (mbar), t (sec)	staal concentratie (M)	L_p (mm)	V_p	hoeveelheid geïnjecteerd	signaal/ruis verhouding
normale injectie “full scan”	20, 12	2.9×10^{-5}	3.8	17 nl	500 fmol	5/1
normale injectie “SIM”	20, 12	7.25×10^{-7}	3.8	17 nl	12 fmol	5/1
normale injectie tandem MS	20, 12	44×10^{-5}	3.8	17 nl	7.6 pmol	5/1
sample stacking “full scan”	400, 120	1.45×10^{-7}	760	3.4 μ l	500 fmol	5/1
sample stacking “SIM”	400, 120	3.63×10^{-9}	760	3.4 μ l	12 fmol	5/1
sample stacking tandem MS	400, 120	22×10^{-7}	760	3.4 μ l	7.6 pmol	5/1

Wanneer gedurende de detectie enkel de $(M-H)^-$ m/z waarden 321.14 Da (TMP) en 330.01 Da (dAMP) gedetecteerd worden, deze techniek wordt “Selected Ion Monitoring” (SIM) genaamd, waarbij alternerend gedurende 0.3 sec. enkel die exacte massa wordt gevolgd (span 0.00 Da) en het toestel dus niet meer hoeft te scannen is de techniek een factor 40 gevoeliger (zie tabel 3.2). Ook blijkt de lineariteit van de respons beter verband te houden met de geïnjecteerde hoeveelheid dan onder “full scan”-condities (zie figuur 3.8), de correlatiecoëfficiënt r bedraagt gemiddeld 0.9996 over een injectie-interval van 12.5 tot 500 fmol.

SIM-condities kunnen gebruikt worden om de aanwezigheid (en concentratie) van een of enkele vooraf geselecteerde adducten in een DNA-hydrolysaat na te gaan. Wanneer we ervan uitgaan dat bij het uitvoeren van *in vivo* experimenten maximaal 500 µg DNA beschikbaar is, dan betekent dit dat deze CZE-ES-MS-techniek in de SIM-modus (met een detectielimiet van 12 fmol) in staat is om 1 adduct op 10^8 ongemodificeerde nucleotiden te detecteren. Daar men stelt dat in mensen die blootgesteld geweest zijn aan omgevingscarcinogenen, zo weinig als 1 modificatie per 10^7 tot 10^8 nucleotiden kan voorkomen (Farmer, 1994), opent dit de weg naar *in-vivo* DNA-adduct onderzoek door middel van CZE-ES-MS.



Gebruikmakend van de ontwikkelde *on-line* “sample stacking”-techniek (Hoofdstuk III.3.4) kon de gevoeligheid van zowel de “full scan” als de SIM-detectie met een factor 200 verbeterd worden (zie tabel 3.2) door het staal na injectie van een extreem lange plug (400 mbar, 120 sec.) op het capillair in een smalle zone te focussen. Zodoende werd een detectielimiet van 1.45×10^{-7} M bekomen voor de “full scan”-condities en van 3.63×10^{-9} M onder SIM-omstandigheden (Deforce et al., 1996). Deze detectielimiet is vergelijkbaar met de detectielimiet die door Thompson

et al. (1993) werd bekomen met transitieve CITP/CZE-MS als *on-line* concentratietechniek. Gebruikmakend van “full scan” (600-1850 Da) condities bekwamen zij een detectielimiet van 5×10^{-7} M. De bekomen detectielimiet is een factor 10 beter dan bekomen werd gebruikmakend van een vergelijkbare “sample stacking”-techniek in combinatie met CZE-CF-FAB-MS (Wolf en Vouros, 1995) (5×10^{-6} M). Deze concentratietechniek gebeurde echter niet volledig *on line*. Het capillair werd gedurende het “stackings”-proces in een buffervaatje ondergedompeld.

De detectielimiet voor het opnemen van productionenspectra werd bepaald door het uitvoeren van CID-tandem-MS (Hoofdstuk III.3.2) op TMP (zie tabel 3.2). Daartoe werd de massa bij m/z 321 geselecteerd in de eerste quadrupole en werd een botsingsenergie van 21 eV gebruikt in de collisiecel. De minimale hoeveelheid nodig voor het bekomen van een bruikbaar productionenspectrum bedraagt 7.6 pmol (S/R 5/1 voor de meest intense pieken in het spectrum). De mogelijkheid om productionenspectra op te nemen is van primordiaal belang voor ons verder onderzoek om de structuur van de DNA-adducten te kunnen ophelderen.

III.4.6. CZE-ES-QTOF

De detectielimieten van het CZE-ES-QTOF-systeem werden eveneens bepaald door verdunningen van een standaardoplossing van dAMP/TMP te analyseren onder de geoptimaliseerde condities (Hoofdstuk III.3.3). Met behulp van de formules 11 - 13 (Hoofdstuk II) werd de injectiehoeveelheid berekend. Een detectielimiet van 26 fmol werd bekomen voor de MS-modus (zie tabel 3.3)(een m/z gebied van 50-800 Da werd opgenomen met een snelheid van 1750 Da/sec). Dit betekent een winst in gevoeligheid met een factor 20 in vergelijking met CZE-ES-MS in “full scan”-modus op een conventioneel quadrupool toestel (DeForce et al., 1998). Deze gevoeligheid benadert de gevoeligheid bereikt met CZE-ES-MS onder SIM-condities. Evenwel wordt met de CZE-ES-QTOF-techniek met eenzelfde gevoeligheid veel meer informatie bekomen. Dit betekent dat de CZE-ES-QTOF-techniek in staat is om 1 adduct op 10^8 ongemodificeerde adducten te detecteren en op te sporen. Gezien de mogelijkheid tot het opnemen van “full

scan"-spectra bij de detectielimiet kan men met deze techniek onbekende adducten opsporen. Dankzij deze techniek wordt de weg geopend om onbekende adducten op te sporen in *in-vivo* stalen van personen, blootgesteld aan omgevingscarcinogenen.

TABEL 3.3: Detectielimieten bekomen voor de CZE-ES-QTOF-analyse (condities Hoofdstuk III.3.3 en III.3.5) van de verdunningen van een mengsel van dAMP en TMP.

	ΔP (mbar), t (sec)	staal concentratie (M)	L_p (mm)	V_p	hoeveelheid geïnjecteerd	signaal/ruis verhouding
normale injectie MS modus	20, 12	1.5×10^{-6}	3.8	17 nl	26 fmol	5/1
normale injectie tandem MS	20, 12	2.3×10^{-5}	3.8	17 nl	400 fmol	5/1
sample stacking MS modus	400, 120	7.5×10^{-9}	760	3.4 μ l	26 fmol	5/1
sample stacking tandem MS	400, 120	1.2×10^{-7}	760	3.4 μ l	400 fmol	5/1

De detectielimiet voor het opnemen van productionenspectra werd bepaald door het uitvoeren van CID-tandem-MS (Hoofdstuk III.3.5) op TMP (zie tabel 3.3). Daartoe werd de massa bij m/z 321 geselecteerd in de eerste quadrupool en werd een botsingsenergie van 21 eV gebruikt in de collisiecél. De minimale hoeveelheid nodig voor het bekomen van een bruikbaar productionenspectrum bedraagt 400 fmol (S/R 5/1 voor de meest intense pieken in het spectrum). Deze detectielimiet is net iets lager dan de detectielimiet bekomen onder "full scan"-condities voor CZE-ES-MS met de conventionele quadrupool.

Gebruikmakend van de "sample stacking"-techniek (Hoofdstuk III.3.4) konden de stalen met een factor 200 geconcentreerd worden op het capillair in een smalle zone, waardoor detectielimieten bereikt werden voor de MS-modus van 7.5×10^{-9} M (zie tabel 3.3) en van 1.2×10^{-7} M voor CID-tandem-MS.

III.5. Besluit

De koppeling tussen CZE en massaspectrometrische detectie werd bewerkstelligd via een elektropray-ionisatie-interface en de kritische parameters van de koppeling werden geoptimaliseerd. In eerste instantie werden de mogelijkheden van een “triple-quadrupool”-massaspectrometer afgetast en nadien werden de mogelijkheden van de recente “Q-TOF”-massaspectrometer geëvalueerd. De gevoeligheid van het “triple-quadrupool”-toestel bleek voldoende voor het uitvoeren van CZE-ES-MS en CID-tandem-MS experimenten op *in-vitro* bereide DNA-adducten. De mogelijkheid om CID-tandem-MS uit te voeren was van primordiaal belang om, in het verdere verloop van het onderzoek, de structuur van de DNA-adducten te kunnen ophelderen. Gebruik makende van de SIM-modus wordt de weg geopend naar *in-vivo* DNA-adductonderzoek.

Bovendien waren wij de eersten om de “sample stacking”-techniek volledig *on line* uit te voeren in combinatie met elektropray-massaspectrometrie. Dankzij deze *on-line* “sample stacking”-techniek werd de gevoeligheid van de CZE-ES-MS techniek met een factor honderd verhoogd. Deze winst in gevoeligheid was eveneens belangrijk in het licht van ons verder DNA-adductonderzoek.

III.6. Referenties

- Banks JF and Dresch T. Detection of fast capillary electrophoresis peptide and protein separations using electrospray ionization with a Time-of-Flight mass spectrometer. *Anal. Chem.* 1996, 68, 1480-1485.
- Banks JF. Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray/mass spectrometry. *Electrophoresis.* 1997, 18, 2255-2266.
- Chien RL and Burgi DS. Sample stacking of an extremely large injection volume in high-performance capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 1992, 64, 1046-1050.
- Deforce DLD, Ryniers FPK, Lemière F, Esmans E and Van den Eeckhout EG. Analysis of DNA adducts in DNA hydrolysates by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1996, 68, 3575-3584.
- Deforce DLD, Raymackers J, Meheus L, Van Wijnendaele F, De Leenheer A and Van den Eeckhout EG. Characterization of DNA oligonucleotides by coupling of capillary zone electrophoresis to electrospray ionization Q-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3060-3068.
- Edmonds CG, Loo JA, Barinaga CJ, Udseth HR and Smith RD. Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1989, 474, 21-37.
- Farmer PB. Carcinogen adducts: Use in diagnostics and risk assesment. *Clin. Chem.* 1994, 40/7, 1438-1443.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF and Whitehouse CM. Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrom. Rev.* 1990, 9, 37-70.
- Iribarne JV and Thomson BA. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* 1976, 64, 2287-2284.
- Lemière F, Esmans EL, Van Dongen W, Van den Eeckhout E and Van Onckelen H. Evaluation of liquid chromatography-thermospray mass spectrometry in the determination of some phenylglycidyl

ether-2'-deoxynucleoside adducts. J. Chromatogr. A. 1993, 647, 211-218.

- Lemière F, Joos P, Vanhoutte K, Esmans EL, De Groot A, Claeys M and Van den Eeckhout E. Phenylglycidyl ether adducts of 2'-deoxycytidine and 2'-deoxyadenosine: Stability in solution and structure analysis by electrospray tandem mass spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1996, 7, 682-691.

- Roepstorff P. Mass spectrometry in protein studies from genome to function. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997, 8, 6-13.
- Schrader W and Linscheid M. Determination of styrene oxide adducts in DNA and DNA components. *J. Chromatogr. A.* 1995, 717, 117-125.
- Smith RD, Olivares JA, Nguyen NT and Udseth HR. Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface. *Anal. Chem.* 1988, 60, 436-441.
- Smith RD, Loo JA, Edmonds CG, Barinaga J and Udseth HR. New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Anal. Chem.* 1990, 62, 882-899.
- Smith RD, Wahl JH, Goodlett DR and Hofstadler SA. Capillary electrophoresis/Mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1993, 65, 574A-584A.
- Thomson BA and Iribarne JV. Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J. Chem. Phys.* 1979, 71, 4451-4463.
- Thompson TJ, Foret F, Vouros P and Karger BL. Capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry: improvement of protein detection limits using on-column transient isotachophoretic sample preconcentration. *Anal. Chem.* 1993, 65, 900-906.
- Udseth HR, Loo JA and Smith RD. Capillary isotachophoresis/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1989, 61, 228-232.
- Vanhoutte K, Joos P, Lemière F, Van Dongen W, Esmans EL, Claeys M and Van den Eeckhout E. Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry of the DNA adducts formed between 2'-deoxynucleosides and bisphenol A diglycidyl ether. *J. Mass Spectrom.* 1995, 30, 1453-1461.
- Vanhoutte K, Van Dongen W, Esmans EL, Van den Eeckhout E and Van Onckelen H. A strategy for the identification of 2'-deoxynucleoside and 2'-deoxynucleotide adducts using electrospray tandem mass spectrometry. *Eur. Mass Spectrom.* 1996, 2, 181-192.
- Wolf SM, Vouros P, Norwood C and Jackim E. Identification of deoxynucleoside polyaromatic hydrocarbon adducts by capillary zone electrophoresis-continuous flow-fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1992, 3, 757-761.
- Wolf SM and Vouros P. Incorporation of sample stacking techniques into the capillary electrophoresis CF-FAB mass spectrometric analysis of DNA adducts. *Anal. Chem.* 1995, 67, 891-900.

Hoofdstuk IV: Onderzoek van de interactie van PGE met 5'-monofosfaat-nucleotiden.

IV.1. Literatuuroverzicht

Voor het onderzoek naar de DNA-adductvorming van PGE werden, tot bij aanvang van dit werk, de nucleosiden geselecteerd als modelcomponenten (Van den Eeckhout, 1991; Van den Eeckhout et al., 1991; Lemière et al., 1993; Lemière et al., 1996). In dit literatuuroverzicht zal, per nucleoside, besproken worden welke de adducten zijn die dankzij dit onderzoek geïdentificeerd werden. Dit onderzoek vormde de basis voor het in dit hoofdstuk beschreven onderzoek.

IV.1.1. Adducten van 2'-deoxyadenosine met PGE.

Gebruik makende van FAB-MS werden, in het reactiemengsel van 2'-deoxyadenosine (dAdo) en PGE, twee adducten teruggevonden, een mono-gealkyleerd dAdo-PGE adduct dat in overmaat gevormd werd en een di-gealkyleerd dAdo-PGE bijproduct (Van den Eeckhout, 1991). Met behulp van UV-spectroscopie en NMR werd bepaald dat de alkylatie in het mono-gealkyleerd adduct aanwezig was op de N-1. Het di-gealkyleerde adduct werd aan de hand van zijn FAB-MS en FAB-MS/MS spectrum geïdentificeerd als N-1, N⁶ gealkyleerd. Uit de experimenten van Lemière et al. (1996) blijkt dat het initieel gevormde N-1 dAdo gealkyleerde adduct onstabiel is en via een Dimroth omlegging omgezet wordt tot het N⁶ gealkyleerde dAdo. De halfwaardetijd van deze omlegging bedraagt 20.78 uur bij 37°C.

IV.1.2. Adducten van 2'-deoxyguanosine met PGE.

In het reactiemengsel van 2'-deoxyguanosine (dGuo) en PGE werden de volgende adducten geïdentificeerd met behulp van UV-spectroscopie, FAB-MS, FAB-MS/MS en NMR: twee diastereomeren van het N-7 gealkyleerde dGuo, een N² gealkyleerd dGuo-PGE adduct, een di-gealkyleerd dGuo-PGE adduct en een imidazoolring-geopend product (Van den Eeckhout, 1991; Van den Eeckhout et al., 1991). Bovendien werden eveneens twee N-7 gealkyleerde guanineadducten teruggevonden. Hun aanwezigheid kon verklaard worden door het optreden van een depurinatiereactie van de N-7 gealkyleerde dGuo adducten. Hemminki en Lax (1986) namen dezelfde depurinatiereacties en imidazool-ring-openingsreactie waar voor de N-7 gealkyleerde dGuo adducten van trichloropropyleenoxide, epichloorhydrine en glycidol.

IV.1.3. Adducten van 2'-deoxycytidine met PGE.

Met behulp van UV-spectroscopie, FAB-MS, FAB-MS/MS en NMR werden in het reactiemengsel van 2'-deoxycytidine (dCyd) en PGE drie adducten geïdentificeerd: twee diastereomeren van het N-3 gealkyleerde dCyd en een N⁴ gealkyleerd dCyd-PGE adduct (Van den Eeckhout, 1991; Van den Eeckhout et al., 1991). Uit de experimenten van Lemière et al. (1993; 1996) blijkt dat het initieel gevormde N-3 gealkyleerde dCyd door hydrolytische deaminatie omgezet wordt tot het N-3 gealkyleerde 2'-deoxyuridine (dUrd). Na opwarmen van het dCyd-PGE reactiemengsel gedurende 24 uur bij 60°C bleek alle N-3 gealkyleerd dCyd te zijn omgezet tot N-3 gealkyleerd dUrd (Lemière et al., 1996).

IV.1.4. Adducten van thymidine met PGE.

In het reactiemengsel van thymidine en PGE werd slechts één adduct teruggevonden dat bovendien slechts in een lage hoeveelheid aanwezig was. Dit adduct werd met behulp van UV-spectroscopie, FAB-MS, FAB-MS/MS en NMR

geïdentificeerd als het N-3 gealkyleerde thymidine (Van den Eeckhout, 1991).

IV.2. Inleiding

Het hoofddoel van dit onderdeel van het onderzoek was om met behulp van de in de vorige hoofdstukken op punt gestelde CZE-scheiding en *on-line* CZE-ES-MS koppeling na te gaan welke adducten gevormd werden bij de reactie van PGE met de verschillende 5'-monofosfaatnucleotiden. De 5'-monofosfaatnucleotiden werden geselecteerd als modelcomponenten voor de adductvorming, en niet de nucleosiden, met het oog op de uiteindelijke doelstelling van dit onderdeel van deze doctoraatsthesis. Dit doel was het bepalen van de interactie van PGE met kalfthymus DNA. Om geen adducten uit het oog te verliezen werd ervoor geopteerd om het DNA te hydrolyseren tot zijn 5'-monofosfaatnucleotide bouwstenen. Bij het merendeel van het DNA-adductonderzoek dat uitgevoerd was bij de aanvang van deze thesis werd de hydrolyse van het DNA uitgevoerd tot op het nucleoside niveau (Dizdaroglu, 1994), waardoor eventuele fosfaataalkyleringen over het hoofd gezien werden.

Bovendien was het de bedoeling van dit onderdeel van het onderzoek om met behulp van CID, CZE-ES-MS/MS productionenspectra op te nemen van de adducten aanwezig in de reactiemengsels van PGE met de 5'-monofosfaatnucleotiden. Deze productionenspectra zijn belangrijk als referentie voor de verdere identificatie van de adducten aanwezig in de DNA-hydrolysaten na interactie van PGE met kalfthymus DNA. Dit onderzoek is eveneens belangrijk om de CZE-ES-MS/MS omstandigheden, meer bepaald de botsingsenergie, te bepalen die aanleiding geeft tot een geschikte fragmentatie van het adduct.

IV.3. Materiaal en methoden

IV.3.1. Chemicaliën

2'-Deoxycytidine-5'-monofosfaat (dCMP) en 2'-deoxyadenosine-5'-monofosfaat (dAMP) waren van Janssen Chimica (Beerse). Thymidine-5'-monofosfaat (TMP), 2'-deoxyguanosine-5'-monofosfaat (dGMP), methanol, isopropanol en ammoniumcarbonaat waren van Sigma (St. Louis, MO, VS). (±)-2,3-epoxypropylfenylether (PGE) was van Aldrich (Steinheim, Duitsland). Het water was van HPLC-kwaliteit en werd bekomen door zuivering van gedesoniseerd water met het Milli-Q Reagent Grade waterzuiveringssysteem (Millipore, Bedford, MA, VS). Het water gezuiverd met dit systeem voldeed ruim aan alle ISO3696/BS3978 standaarden voor graad-I-zuiverheid en bezat een weerstand van 18.2 MΩ.cm. Alle gebruikte chemicaliën waren van *pro analysi* kwaliteit.

IV.3.2. Adductbereiding

Om microbiële contaminatie te vermijden werden alle manipulaties uitgevoerd in een LAF kast. Het HPLC-water, alle glaswerk, plastic- en andere recipiënten werden voor gebruik geautoclaveerd. Alle buffers en niet-autoclaveerbare oplossingen werden onderworpen aan filtersterilisatie (0.22 µm poriën steriele celluloseacetaat-spuutfilters van Roth, Karlsruhe, Duitsland).

De 5'-monofosfaatnucleotiden werden opgelost in HPLC-water aan een concentratie van 2 mg/ml en werden onderworpen aan filtersterilisatie. Aan 1 ml aliquots werd 2 ml van een vers bereide 0.5 M methanolische oplossing van PGE toegevoegd. De stalen werden 24 uur geïncubeerd in gesloten reageerbuizen in een incubatoroven op 37°C onder licht schudden. De reacties werden gestopt door de methanol in te dampen onder een stroom stikstofgas, waarbij het resterende PGE neersloeg. Aan de overblijvende vloeistof werd 1 ml HPLC-water toegevoegd en na goed mengen werd dit mengsel drie keer geëxtraheerd met 3 ml chloroform teneinde alle niet-gereageerde PGE te verwijderen, vervolgens werd de waterfase gelyofiliseerd en gereconstitueerd in 6 ml HPLC-water. Een 1 ml aliquot van de

dAMP stockoplossing werd gedurende 48 uur geïncubeerd in methanol, zonder toevoeging van PGE, bij 37°C en werd verder identiek verwerkt aan de overige stalen.

IV.3.3. Analyse van de reactiemengsels met CZE

De CZE-analyses werden uitgevoerd met de in Hoofdstuk II op punt gestelde analyseparameters. Het capillair met een i.d. van 75 µm had een totale lengte van 92.5 cm en de afstand tussen het injectie-uiteinde en de UV-detector bedroeg 61.5 cm. UV-detectie werd uitgevoerd bij een golflengte van 270 nm. Het capillair werd gethermostatiseerd bij 30°C. Als elektroforesebuffer werd een ammoniumcarbonaatbuffer (pH 9.68) met een concentratie van 100 mM aangewend. Injectie van de nucleotide reactiemengsels gebeurde door het aanleggen van een druk van 10 mbar gedurende 6 seconden waarna onmiddellijk de elektroforese gestart werd door het aanbrengen van een spanningsverschil van 17 kV over het capillair.

IV.3.4. Analyse van de reactiemengsels met CZE-ES-MS

De CZE-ES-MS metingen werden alle uitgevoerd op de “triple-quadrupool”-massaspectrometer (VG Quattro II triple-quadrupole, Micromass, Manchester, Engeland). De CZE-ES-MS-methodologie werd uitgebreid beschreven in Hoofdstuk III alwaar de *on-line* koppeling op punt werd gesteld. De metingen werden uitgevoerd gebruik makende van de in Hoofdstuk III geoptimaliseerde omstandigheden. Voor alle experimenten uitgevoerd in dit hoofdstuk werd een massagebied van 160 Da tot 800 Da gescand aan een snelheid van 320 Da/sec. De “sheath”-vloeistof, 80/20 isopropanol/2.5 mM ammoniumcarbonaat (pH 9.68), had een debiet van 7 µl/min. Op het “sheath”-vloeistofcapillair werd een elektrospayspanning van -4.5kV aangelegd, op de “skimmer cone” werd een spanning van +30 V aangelegd en elektroforese werd uitgevoerd bij 13 kV met een additionele druk van 10 mbar over het capillair tijdens de elektroforese. De CZE-ES-MS massa-elektroferogrammen werden bekomen na het uitvoeren van de “sample stacking”-procedure zoals beschreven in Hoofdstuk III.3.4, na injectie van

de stalen bij 40 mbar gedurende 0.5 min.

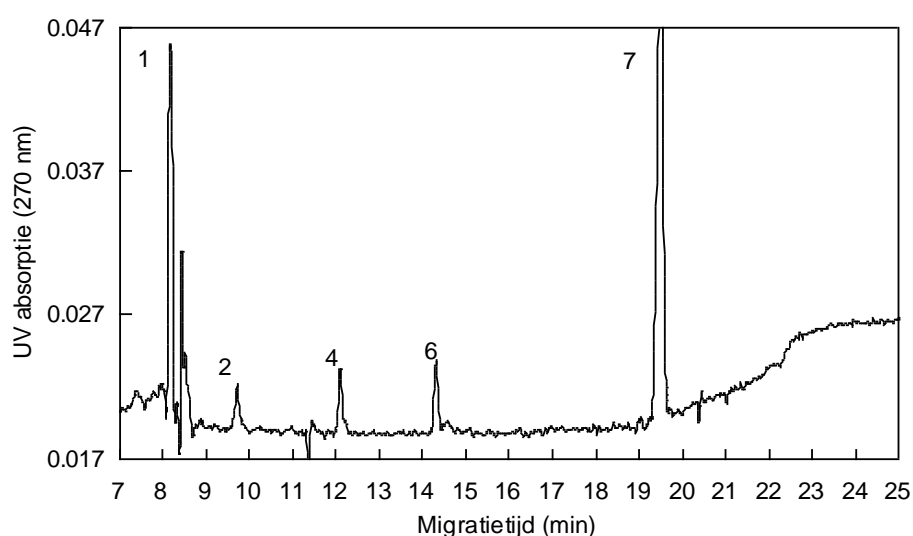
IV.3.5. Analyse van de reactiemengsels met CZE-ES-MS/MS

Teneinde meer structurele informatie te bekomen werden productionenspectra opgenomen (CZE-ES-MS/MS), zoals beschreven in Hoofdstuk III.3.2. Daarbij werd de eerste quadropool groep gebruikt om een gewenst moederion te selecteren, dat vervolgens in de botsingsgascel gefragmenteerd werd. De botsingsenergie werd, afhankelijk van het product, geoptimaliseerd tussen 15 en 35 eV bij een Argon gasdruk van 3×10^{-3} mbar. Teneinde voldoende staal op het capillair te kunnen injecteren om CZE-ES-MS/MS mogelijk te maken werd de "sample stacking"-techniek gebruikt zoals beschreven in Hoofdstuk III.3.4. De hoeveelheid staal die hierbij geïnjecteerd werd was afhankelijk van de concentratie van het desbetreffende adduct in het reactiemengsel. Tenzij anders vermeld werden alle CZE-ES-MS/MS experimenten uitgevoerd in de negatieve elektro spray mode.

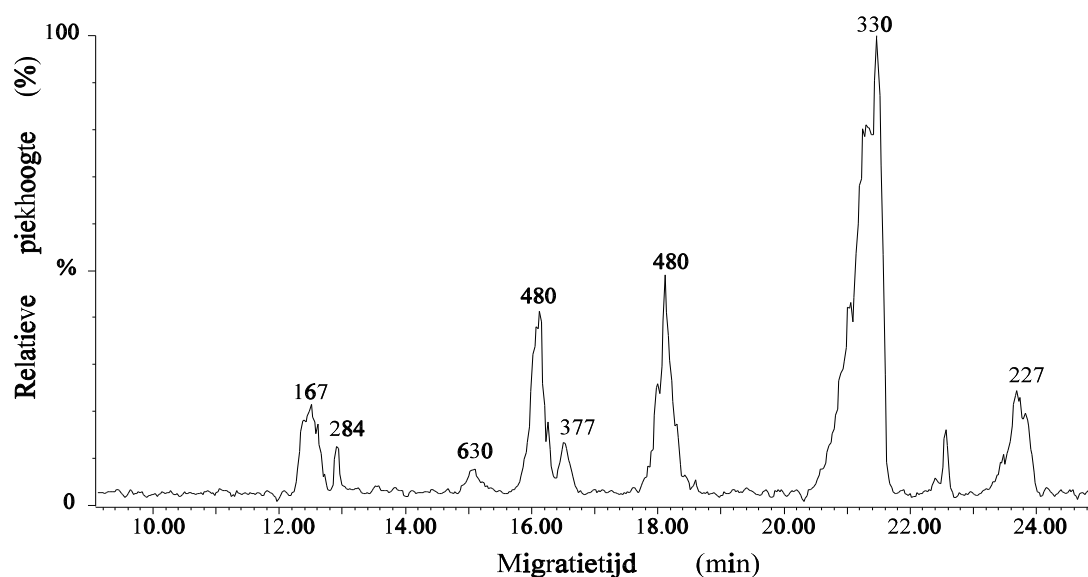
IV.4. Resultaten en bespreking

IV.4.1. Adducten van dAMP met PGE

Analyse op CZE (condities zie Hoofdstuk IV.3.3) van het reactiemengsel van dAMP met PGE (zie Hoofdstuk IV.3.2) geeft het elektroferogram weergegeven in figuur 4.1.



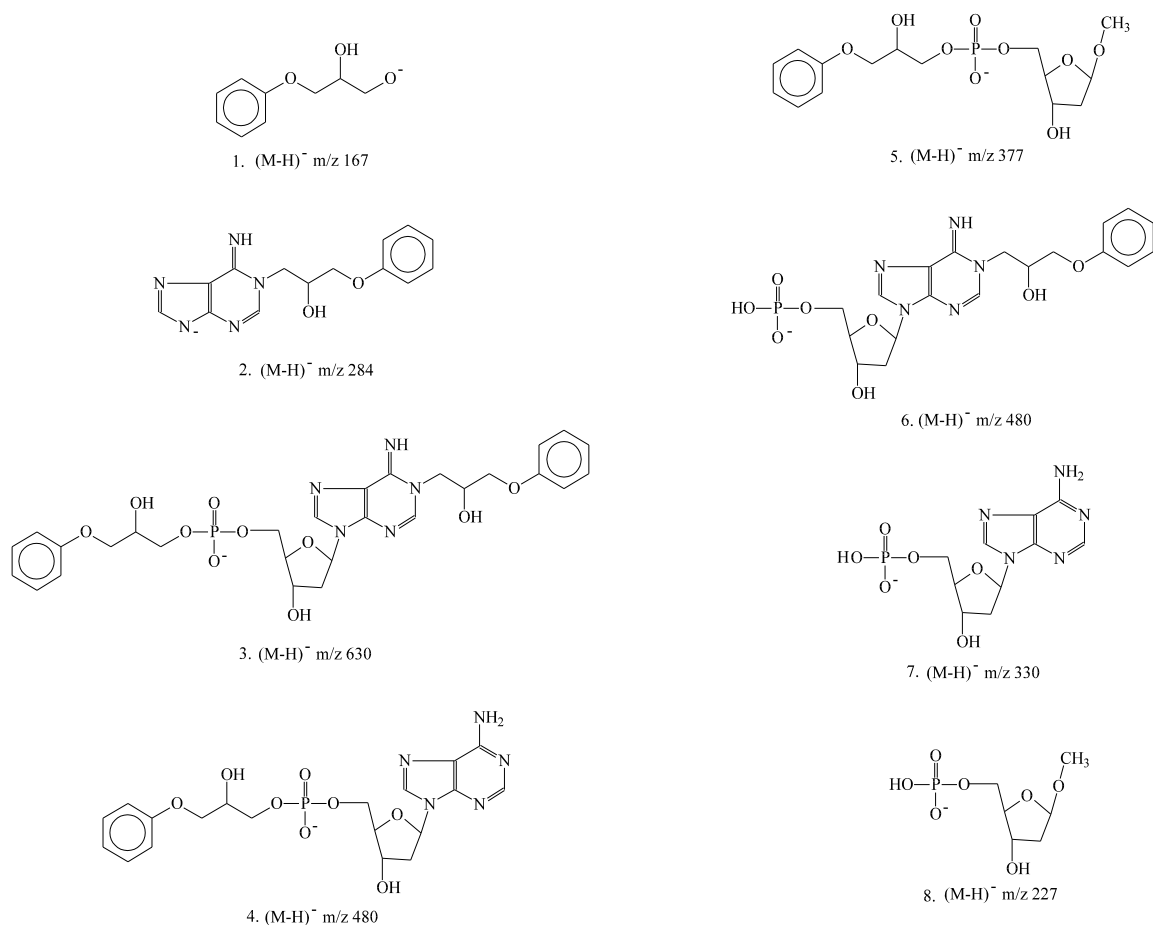
Uit dit elektroferogram blijkt dat PGE in grote mate reageert met het dAMP. De nucleotidepiek (7) in het elektroferogram werd geïdentificeerd door vergelijking van de migratietijden met de migratietijd van ongewijzigd dAMP. De overige pieken werden geïdentificeerd door middel van CZE-ES-MS- en CZE-ES-MS/MS-analyse. Het massa-elektroferogram bekomen na CZE-ES-MS-analyse van het reactiemengsel van dAMP en PGE vertoont de volgende massa's (zie figuur 4.2). Aan de hand van hun $(M-H)^-$ m/z -waarde konden de verbindingen tentatief geïdentificeerd worden, zie tabel 4.1. Opmerkelijk is de aanwezigheid van twee mono-adducten van PGE met dAMP ($m/z = 480$), beide met ongeveer dezelfde intensiteit maar met een sterk verschillend migratiegedrag.



TABEL 4.1: Tentatieve karakterisering van de producten aanwezig in het dAMP-PGE reactiemengsel. De t_m waarden zijn die bekomen na CZE-ES-MS-analyse.

piek	t_m (min)	m/z waarde (M-H) ⁻	tentatieve karakterisering
1	12.5	167	PGE-diol
2	12.9	284	mono-adduct van adenine met PGE
3	15.1	630	di-adduct van dAMP met PGE
4	16.1	480	mono-adduct van dAMP met PGE
5	16.5	377	PGE adduct van deoxyribose gemethoxyleerd op C-2' en gefosforyleerd op C-5'
6	18.1	480	mono-adduct van dAMP met PGE
7	21.4	330	dAMP
8	23.8	227	deoxyribose gemethoxyleerd op C-2' en gefosforyleerd op C-5'

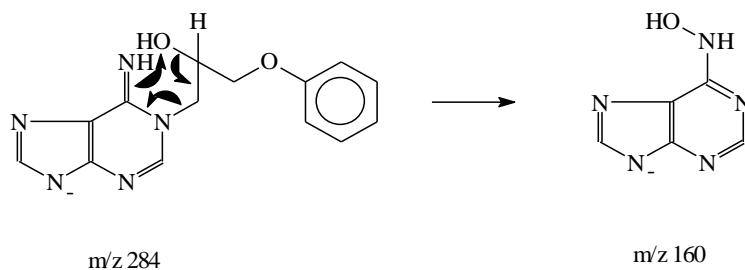
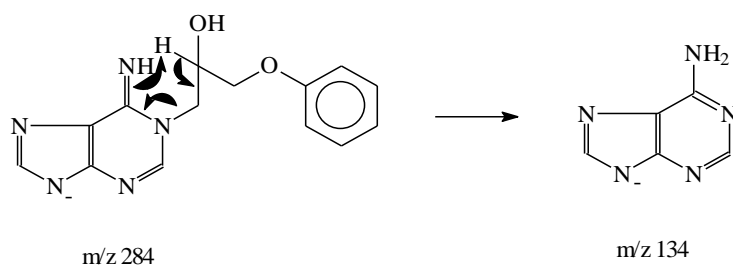
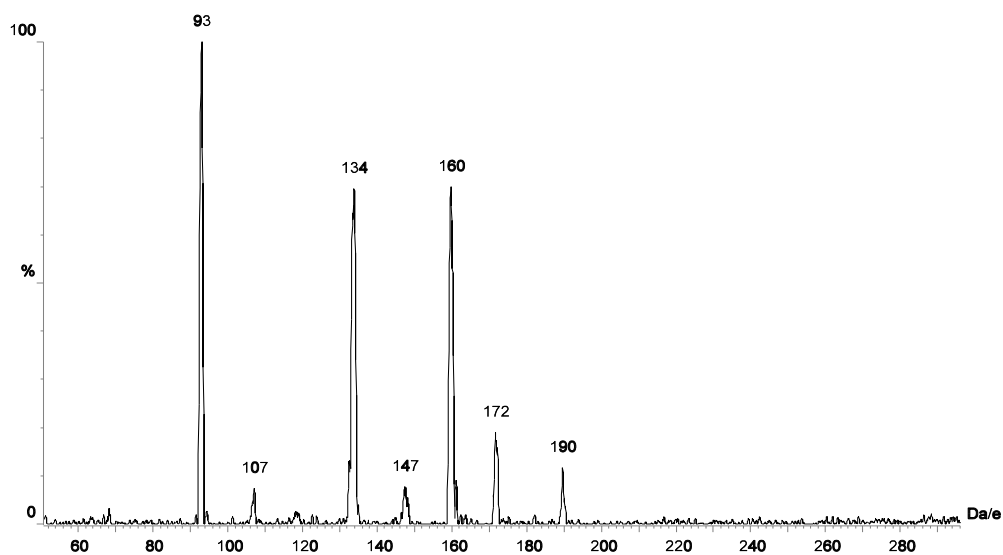
Het PGE-diol ($t_m = 12.5$ min.) ontstaat door hydrolyse van het epoxide. Om meer structurele informatie te bekomen werden, door middel van CZE-ES-MS/MS, de laag energetische CID-spectra opgenomen van de overige componenten. De structuur van deze producten wordt weergegeven in figuur 4.3.



IV.4.1.1. Mono-adduct van adenine met PGE, $t_m = 12.9$ min.

De aanwezigheid van een kleine hoeveelheid PGE-adenine, (M-H)⁻ bij m/z 284, kan te wijten zijn aan de reactie met PGE van een kleine hoeveelheid adenine mogelijks aanwezig, als onzuiverheid, in de stockoplossing van dAMP of kan tijdens de reactie met PGE gevormd worden door depurinatiereactie. Alhoewel depurinatie een heel aannemelijk reactiemechanisme is, dat ook plaatsgrijpt wanneer adducten gevormd worden *in vivo*, kan niet uitgesloten worden dat er reeds een hoeveelheid adenine aanwezig was in de stockoplossing van dAMP. Deze onzuiverheid wordt eveneens gevormd door een depurinatiereactie. De identiteit van dit adduct, $t_m = 12.9$ min., werd bewezen aan de hand van zijn CZE-ES-MS/MS productionenspectrum (zie figuur 4.4). De PGE-alkylering kan aanwezig zijn op de N-1, wat de originele alkyleringsplaats is (Van den Eeckhout, 1991; Lemière et al., 1996) of op de exocyclische N⁶. Dit adduct wordt gevormd uitgaande van het N-1 gealkyleerd product door een Dimroth-reactie met een eersteorde kinetiek en een halfwaardetijd bij 37°C voor het N-1 reactieproduct van 20.78 uur (Lemière et al., 1996). Dit betekent dat beide verbindingen mogelijk zijn, en het is dus mogelijk dat beide producten co-migreren en dat we hier te maken hebben met een mengspectrum. De belangrijkste fragmenten hebben m/z waarden bij: 93, 134, 160, 172 en 190. Het fragmention bij m/z 93 is het fenolaat-ion. Dit bewijst de aanwezigheid van een PGE-groep. Het ion bij m/z 134 kan toegewezen worden aan het gedeprotoneerde adenine. Het verlies van de PGE-alkylatie kan verklaard worden door de McLafferty-herschikking (Lemière et al., 1996). Deze herschikking is mogelijk zowel uitgaande van het N-1 als van het N⁶ gealkyleerde product, bij wijze van voorbeeld is het mechanisme in figuur 4.5 uitgewerkt voor het N-1 gealkyleerde product. Eenzelfde reactiemechanisme kan opgeschreven worden voor de vorming van het product bij m/z 160. Beide reacties van het N-1 gealkyleerde product geven aanleiding tot de vorming van een aromatische ring, wat de stabiliteit van het gevormde product verhoogt. Dezelfde reacties voor het N⁶ gealkyleerde adduct geven echter geen aanleiding tot de vorming van een aromatische ring, waardoor aangenomen kan worden dat we hier voornamelijk te maken hebben met het N-1

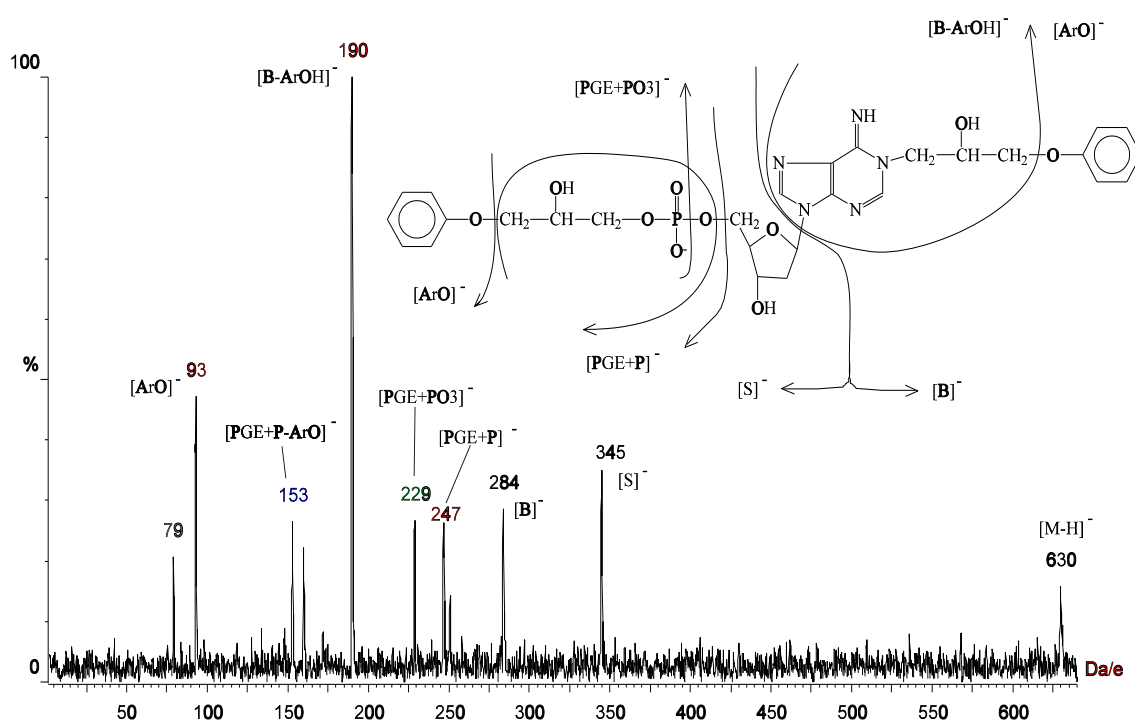
gealkyleerde product. Het production bij m/z 190 ontstaat door het verlies van de fenolgroep en het fragmentation bij m/z 172 door het verlies van water uit het ion bij m/z 190.



IV.4.1.2. Di-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 15.1$ min.

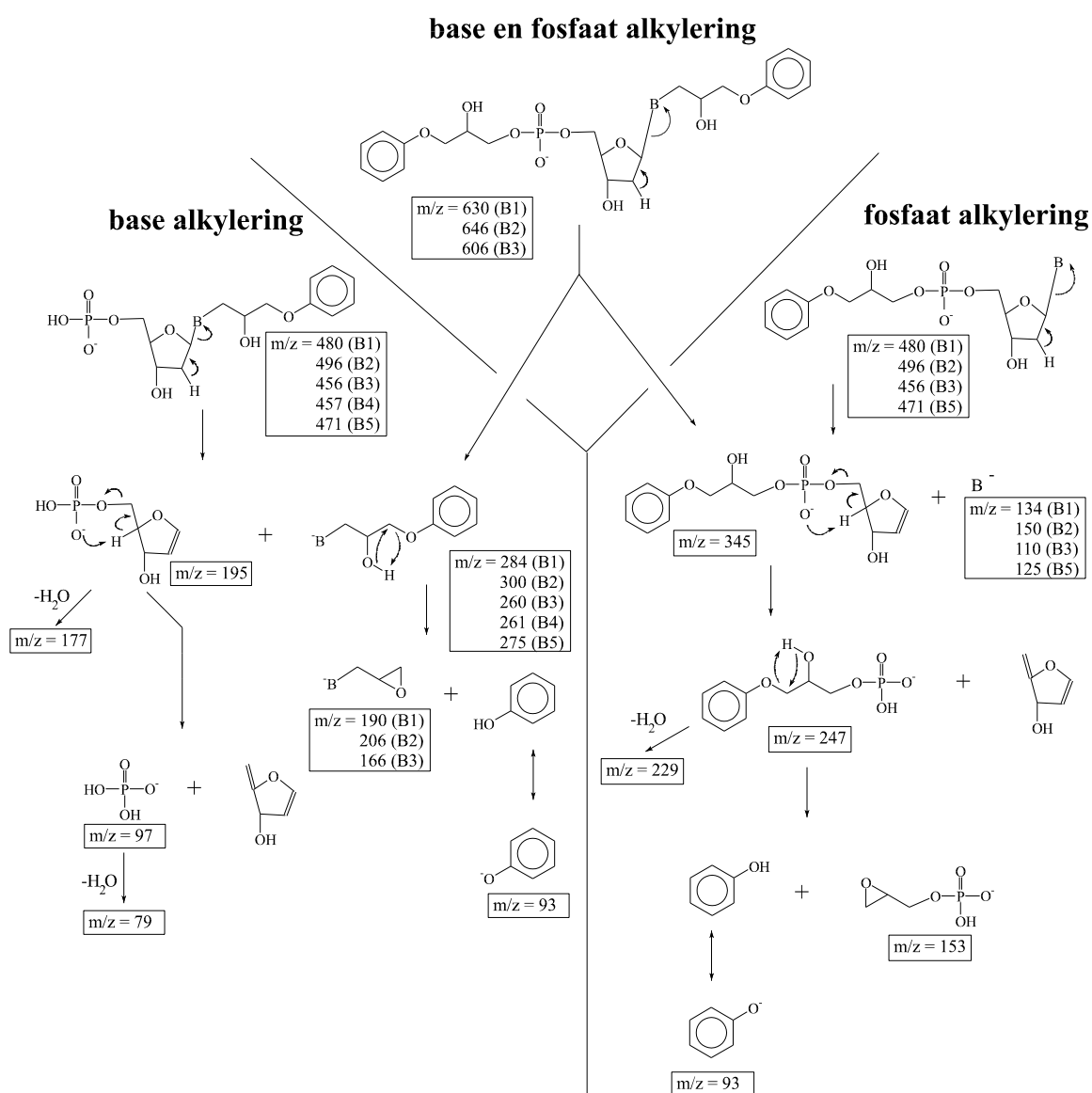
De aanwezigheid van een di-adduct in het reactiemengsel betekent dat

er ofwel op het adeninebase nog een tweede alkyleringsplaats aanwezig is, ofwel dat er naast een alkylering van de base ook een alkylation van de fosfaatgroep is opgetreden. De structuur van dit adduct werd opgehelderd aan de hand van het CZE-ES-MS/MS-spectrum van het product met $t_m = 15.1$ min. (zie figuur 4.6). De belangrijkste diagnostische fragmenten hebben m/z waarden bij: 190, 229, 247, 284 en 345.



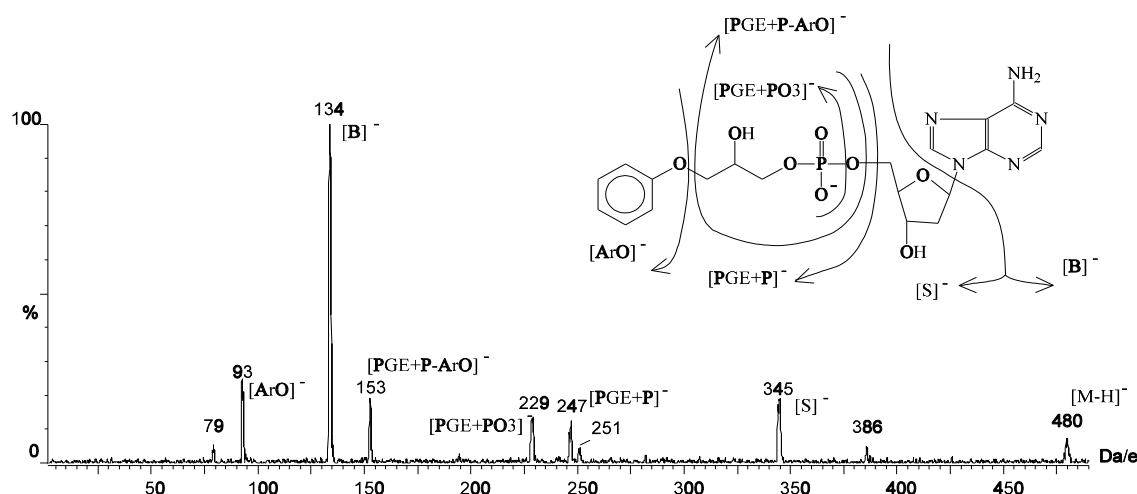
Het ion bij m/z 630 is het intacte moederion $(M-H)^-$. Een mogelijk fragmentatieschema is weergegeven in figuur 4.7. Het fragmentation bij m/z 345 kan toegewezen worden aan de gealkyleerde suikerfosfaatgroep, en het ontstaat door splitsing van de glycosidische binding door 1,2-eliminatie (McLuckey en Habibi-Goudarzi, 1993), net als het ion bij m/z 284 dat kan toegewezen worden aan de gealkyleerde base. De alkyleringsplaats op de base is naar alle waarschijnlijkheid de N-1 positie (Van den Eeckhout, 1991; Lemière et al., 1996; Vanhoutte et al., 1996). Het fragment bij m/z 247 stemt overeen met een gealkyleerde fosfaatgroep en door dehydratatie van de fosfaatgroep ontstaat hieruit het ion bij m/z 229. Deze

beide ionen samen met het ion bij m/z 345 bewijzen de aanwezigheid van een PGE-alkylatie op de fosfaatgroep. Het production bij m/z 190 ontstaat door verlies van de fenolgroep uit het fragment bij m/z 284. Deze beide ionen bewijzen de aanwezigheid van een PGE-alkylatie op de basegroep. We kunnen dus besluiten dat dit di-adduct van dAMP één PGE-alkylering heeft op de N-1 van de adeninebase en één op de fosfaatgroep.



IV.4.1.3. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 16.1$ min.

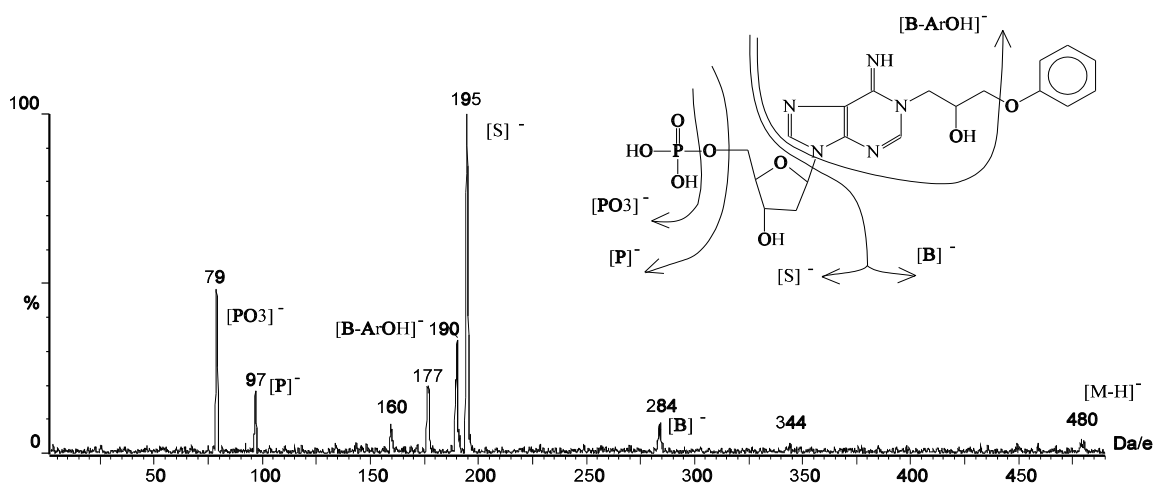
De structuur van dit adduct werd opgehelderd door het opnemen van het CZE-ES-MS/MS-spectrum van het product met $t_m = 16.1$ min. (zie figuur 4.8).



De belangrijkste diagnostische fragmentionen worden gedetecteerd bij m/z: 134, 229, 247 en 345. Het fragment bij m/z 480 is het intacte moederion (M-H)⁻. Een mogelijk fragmentatieschema is weergegeven in figuur 4.7 in het gedeelte van de fosfaatadducten. Het ion bij m/z 345, is net als bij het dAMP di-adduct, afkomstig van de gealkyleerde suikerfosfaatgroep, evenals de ionen bij m/z 247 (gealkyleerde fosfaatgroep) en m/z 229 (dehydratatie van m/z 247). Het fragmentation bij m/z 134 ontstaat door splitsing van de glycosidische binding en is toe te wijzen aan de ongewijzigde adeninebase. De aanwezigheid van deze productionen levert afdoende bewijs om te besluiten dat de PGE-alkylgroep op de fosfaatgroep van het dAMP aanwezig is.

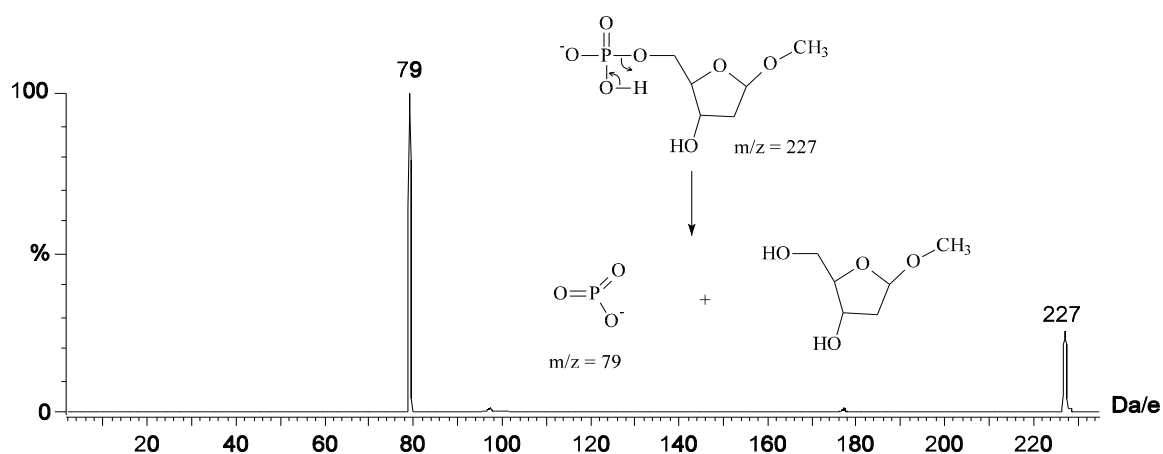
IV.4.1.4. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 18.1$ min.

Het CZE-ES-MS/MS-spectrum van het product met $t_m = 18.1$ min. (zie figuur 4.9) vertoont de volgende fragmentionen die informatie verschaffen over de structuur van $(M-H)^-$ bij m/z 480: m/z 79, 97, 160, 190, 195 en 284. De fragmentatieschema's zijn weergegeven in het gedeelte dat de baseadducten bespreekt in figuur 4.7. Het meest intense production (bij m/z 195) is toe te wijzen aan de suikerfosfaatgroep en ontstaat door splitsing van de glycosidische binding, daarbij wordt eveneens het ion bij m/z 284 gevormd, wat overeenstemt met de gealkyleerde base. De aanwezigheid van het fragment bij m/z 97, dat toegewezen kan worden aan de fosfaatgroep, toont aan dat de fosfaatgroep in dit adduct niet gealkyleerd is. De aanwezigheid van een zwak signaal bij m/z 160 wijst op McLafferty-herschikking van het gealkyleerde basefragment (m/z 284), dit reactiemechanisme is uitgewerkt in figuur 4.5. Dit productionenspectrum is totaal verschillend van het productionenspectrum bekomen voor het fosfaatgealkyleerde dAMP. Ook hier is de modificatie hoogstwaarschijnlijk aanwezig op de N-1 positie van de adeninebase, wat de originele alkyleringsplaats is (Van den Eeckhout, 1991; Lemière et al., 1996; Vanhoutte et al., 1996).



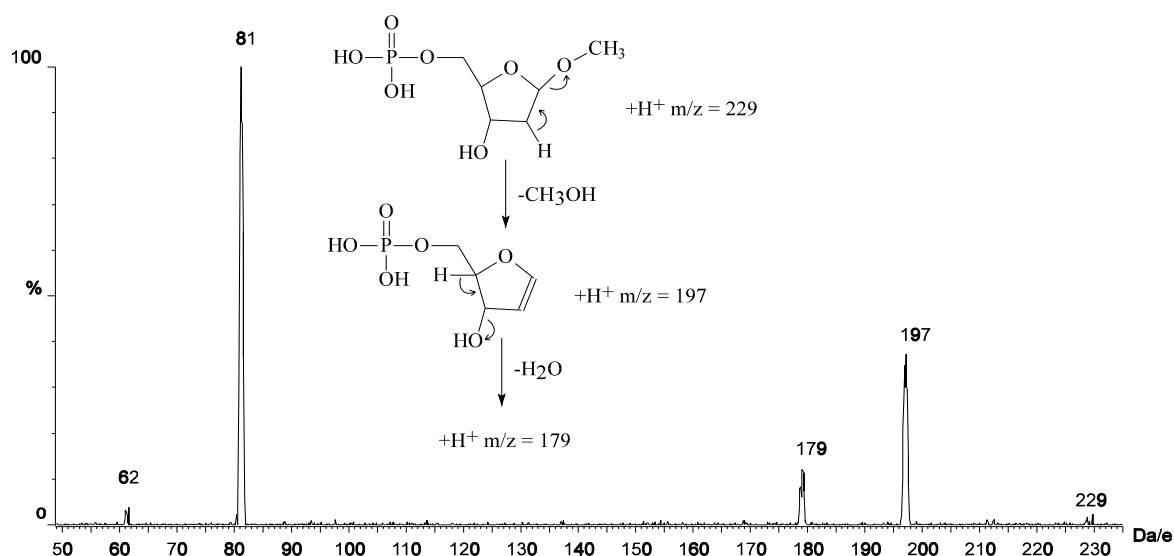
IV.4.1.5. Deoxyribose gemethoxyleerd op C-2' en gefosforyleerd op C-5', $t_m = 23.8$ min.

De structuur van de verbinding met $(M-H)^-$ bij m/z 227 ($t_m = 23.8$ min.) werd bepaald door het opnemen van zijn CZE-ES-MS/MS productionenspectrum (figuur 4.10). Dit spectrum, dat opgenomen werd bij een botsingsenergie van 15 eV, vertoont echter weinig fragmentionen. De CID-geïnduceerde fragmentatie kon niet verbeterd worden door de botsingsenergie te variëren (een gebied van 8 tot 20 eV werd uitgetest). Het enige beduidende production dat aanwezig is (m/z 79) kan toegewezen worden aan defosforylatie van $(M-H)^-$. Dit product werd aan de hand van zijn molecuulmassa (228 Da) en het bewijs van de aanwezigheid van de fosfaatgroep geïdentificeerd als deoxyribose gemethoxyleerd op C-2' en gefosforyleerd op C-5'. De structuur van dit product werd bevestigd door het opnemen van een CZE-ES-MS/MS-spectrum in de positieve elektropraymode (Figuur 4.11). Het fragment bij m/z 197 ontstaat door verlies van methanol uit $(M+H)^+$ m/z 229, en het production bij m/z 179 ontstaat door verlies van water uit het ion bij m/z 197. Het fragmention bij m/z 81 is afkomstig van de fosfaatgroep.



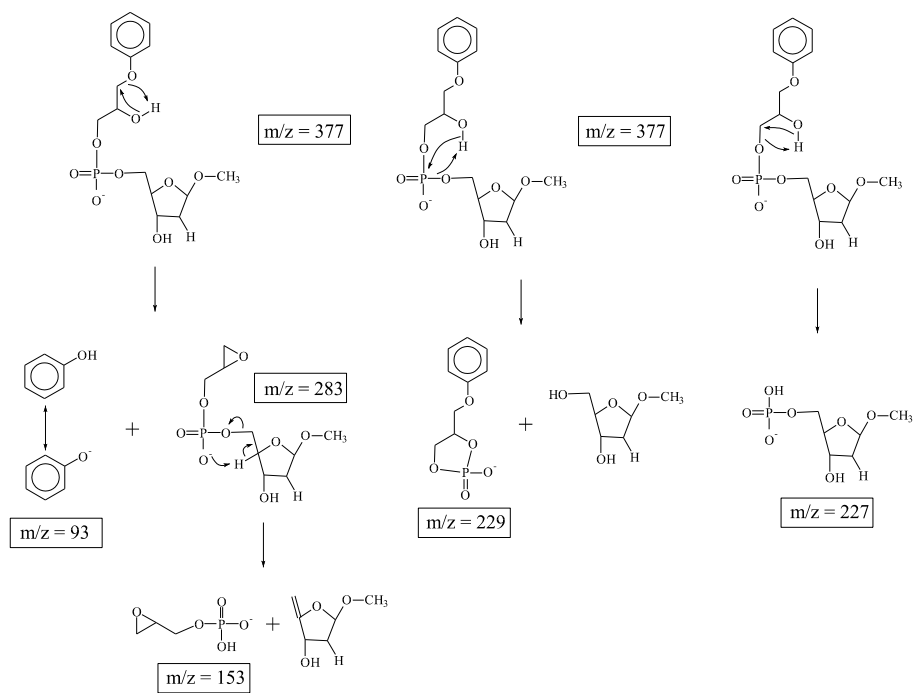
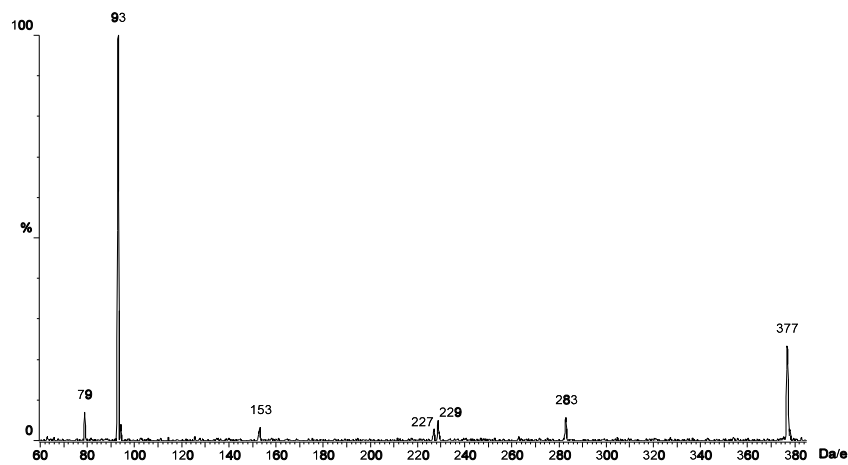
Dit product ontstaat door depurinatie van het dAMP, door solvolysen met methanol. Tijdens deze solvolysen komt de adeninebase vrij die vervolgens kan reageren met

PGE tot vorming van het adenine-PGE-adduct (hierboven beschreven). Een tweede mogelijkheid is dat reeds gevormde dAMP-PGE-adducten solvolyse ondergaan. De aanwezigheid van depurinatieproducten is belangrijk omdat deze aangeven dat kwantitatieve analyses met de grootste omzichtigheid moeten uitgevoerd worden, daar een hoeveelheid van het oorspronkelijk adduct verloren kan gaan door depurinatie.



IV.4.1.6. PGE-adduct van deoxyribose gemethoxyleerd op C-2' en gefosforyleerd op C-5', $t_m = 16.5$ min.

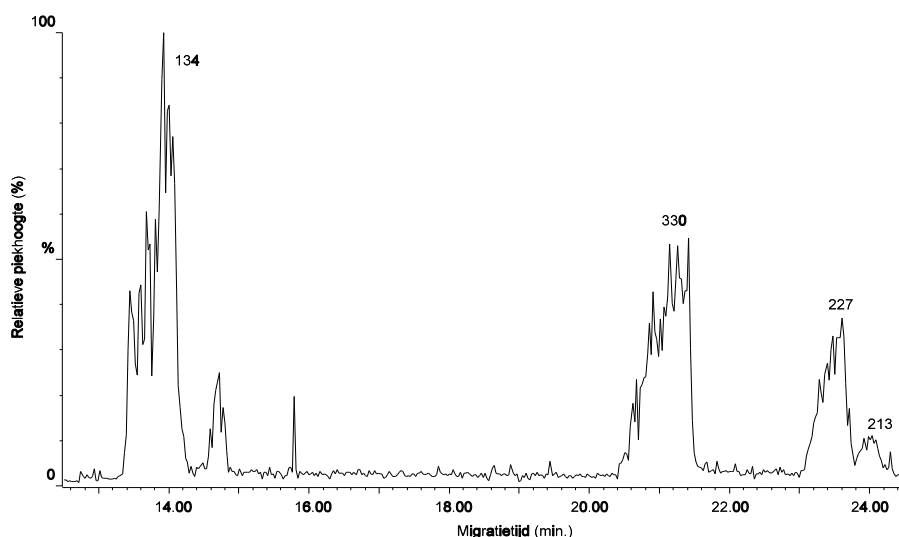
Teneinde de structuur van dit product te achterhalen werd het CZE-ES-MS/MS-spectrum (figuur 4.12) opgenomen van $(M-H)^-$ bij m/z 377 ($t_m = 16.5$ min.). De fragmentatieschema's zijn weergegeven in figuur 4.13. De belangrijkste diagnostische fragmenten hebben m/z waarden bij: 93, 227 en 229. Het fenolaat-ion (m/z 93) bewijst de aanwezigheid van een PGE-groep.



Het product bij m/z 227, wat toegewezen kan worden aan 2'-methoxy-5'-fosfo-deoxyribose, ontstaat door het verlies van de PGE-alkylatie. Het ion bij m/z 229 bewijst de aanwezigheid van de PGE-alkylatie op de fosfaatgroep. Gezien de aanwezigheid van het ongemodificeerde 2'-methoxy-5'-fosfodeoxyribose in het reactiemengsel (zie figuur 4.2, m/z 227 $t_m = 23.8$ min.), kan het hier geïdentificeerde adduct op twee manieren gevormd worden. Een eerste mogelijkheid is fosfaatalkylering van het door depurinatie ontstane 2'-methoxy-5'-fosfo-deoxyribose, een tweede mogelijkheid is depurinatie van het fosfaatgealkyleerde dAMP.

IV.4.1.7. dAMP na incubatie in methanol

Teneinde na te gaan of de depurinatieproducten teruggevonden na incubatie van dAMP met PGE, specifiek waren voor de interactie tussen dAMP en PGE werd een stockoplossing van het dAMP gedurende 48 uur geïncubeerd in methanol, verder werd dit staal op dezelfde wijze behandeld als de reactiemengsels die met PGE werden geïncubeerd.

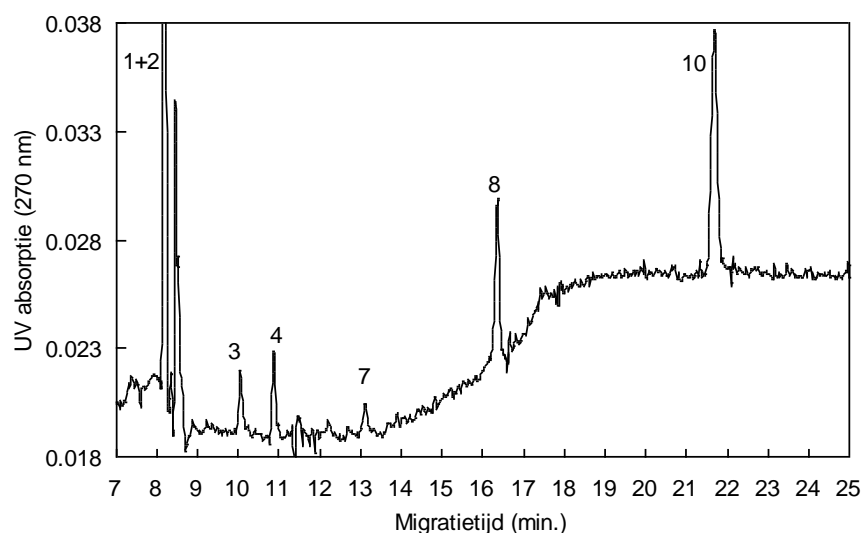


Het massa-elektroferogram bekomen na CZE-ES-MS/MS-analyse (zie figuur 4.14) vertoont de volgende $(M-H)^-$ -ionen: m/z 134, toe te wijzen aan de vrije adeninebase; 330, het ongewijzigde dAMP; 227, toe te wijzen aan 2'-methoxy-5'-fosfo-deoxyribose

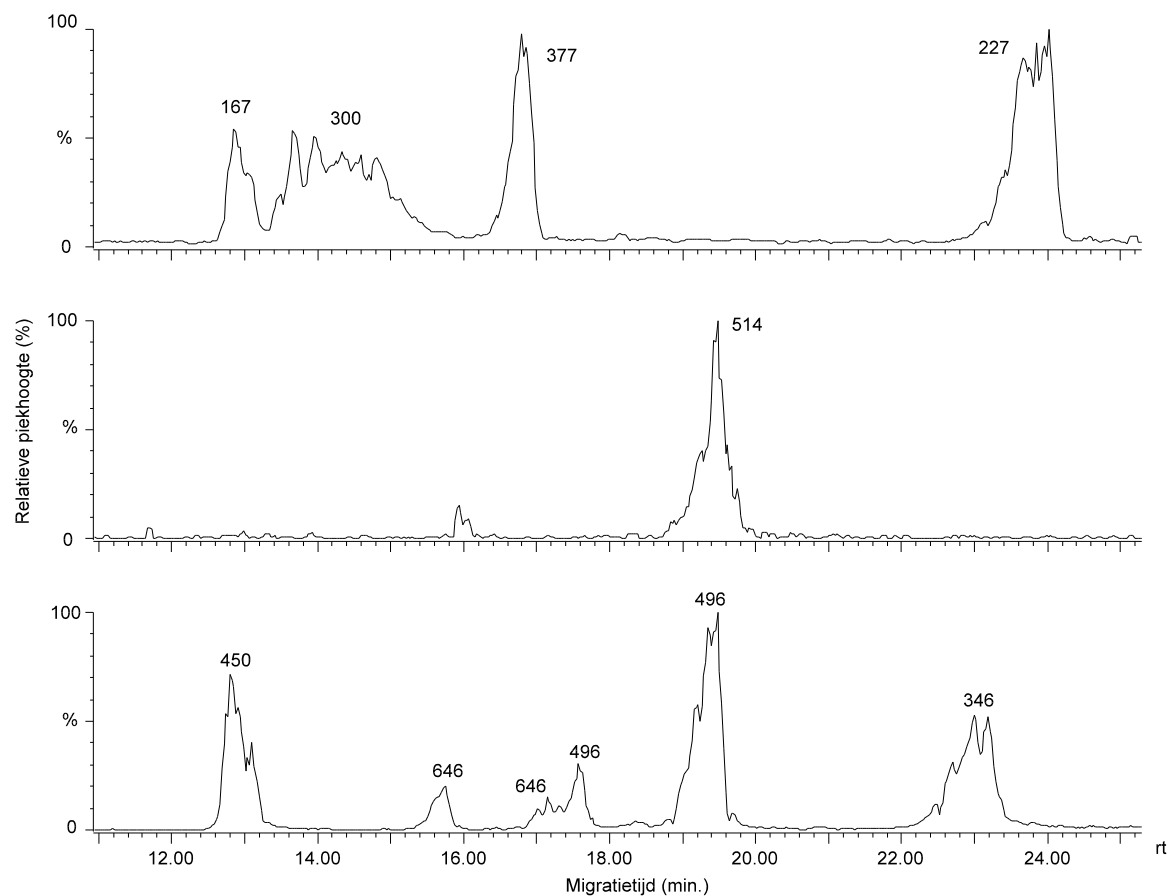
en 213, dat overeenstemt met 2'-hydroxy-5'-fosfo-deoxyribose. Deze verbindingen ontstaan alle door solvolyse (met methanol of met water) van het dAMP tijdens incubatie zonder PGE. Deze depurinatieproducten worden dus onafhankelijk van de aanwezigheid van PGE gevormd en zijn dus niet specifiek voor adductvorming.

IV.4.2. Adducten van dGMP met PGE

Analyse van het reactiemengsel van dGMP met PGE (zie Hoofdstuk IV.3.2) met behulp van CZE (condities zie Hoofdstuk IV.3.3) geeft het elektroferogram weergegeven in figuur 4.15.



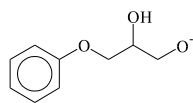
Uit deze analyse blijkt dat PGE eveneens intensief reageert met het dGMP-nucleotide. De nucleotidepiek (10) in dit elektroferogram werd geïdentificeerd door vergelijking van de migratietijden met de migratietijd van ongemodificeerd dGMP. Alle pieken in dit elektroferogram werden geïdentificeerd met behulp van CZE-ES-MS en CZE-ES-MS/MS. Het massa-elektroferogram van het reactiemengsel van dGMP en PGE vertoont de volgende m/z waarden (zie figuur 4.16). Op basis van de bekomen $(M-H)^-$ -waarden konden de verbindingen tentatief geïdentificeerd worden, zie tabel 4.2.



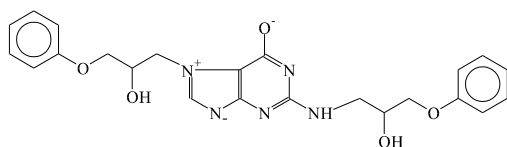
Naast PGE-diol ($t_m = 12.9$ min., $m/z = 167$) is er in de EOF eveneens een product aanwezig met een m/z waarde bij 450. Dit product werd tentatief toegewezen aan de tweemaal gealkyleerde guaninebase. Verder is er eveneens een verbinding met m/z bij 300, wat overeenstemt met de gealkyleerde guaninebase. De structuur van het 2'-methoxy-5'-fosfo-deoxyribose (m/z 227) en van zijn PGE-adduct (m/z 377) werd reeds aangetoond in de bespreking van de adducten van dAMP. Belangrijk is dat in dit reactiemengsel veel depurinatieproducten voorkomen (m/z 450, 300, 377 en 227) met een relatief grote intensiteit (figuur 4.16). Om meer structurele informatie te bekomen werden, door middel van CZE-ES-MS/MS, de laag energetische CID-spectra opgenomen van de overige componenten. De structuur van deze producten wordt weergegeven in figuur 4.17.

TABEL 4.2: Tentatieve karakterisering van de producten aanwezig in het dGMP-PGE reactiemengsel. De t_m waarden zijn deze bekomen na CZE-ES-MS-analyse.

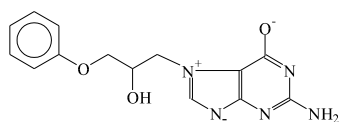
piek	t_m (min)	m/z waarde (M-H) ⁻	tentatieve karakterisering
1	12.9	167	PGE-diol
2	12.9	450	di-adduct van guanine met PGE
3	14.3	300	mono-adduct van guanine met PGE
4	15.7	646	di-adduct van dGMP met PGE
5	16.8	377	PGE adduct van deoxyribose gemethoxyleerd op C-2' en gefosforyleerd op C-5'
6	17.2	646	di-adduct van dGMP met PGE
7	17.6	496	mono-adduct van dGMP met PGE
8	19.4	496	mono-adduct van dGMP met PGE
9	19.5	514	imidazoolring-geopend dGMP-PGE adduct
10	23.0	346	dGMP
11	23.8	227	deoxyribose gemethoxyleerd op C-2' en gefosforyleerd op C-5'



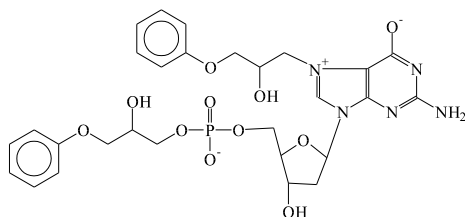
1. (M-H)⁻ m/z 167



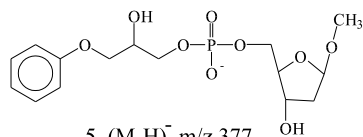
2. (M-H)⁻ m/z 450



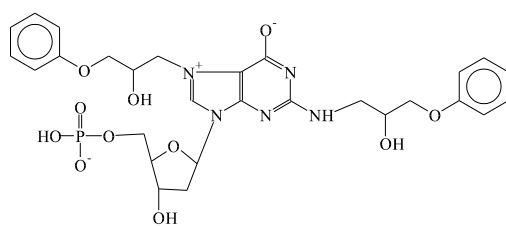
3. (M-H)⁻ m/z 300



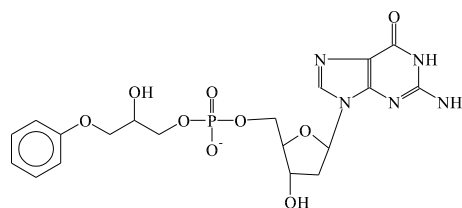
4. (M-H)⁻ m/z 646



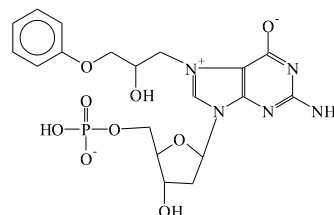
5. (M-H)⁻ m/z 377



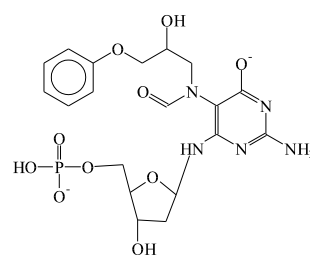
6. (M-H)⁻ m/z 646



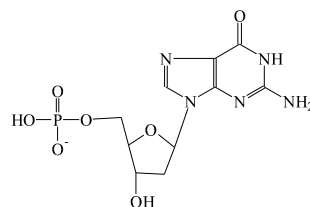
7. (M-H)⁻ m/z 496



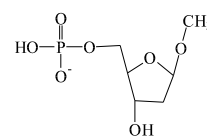
8. (M-H)⁻ m/z 496



9. (M-H)⁻ m/z 514



10. (M-H)⁻ m/z 346



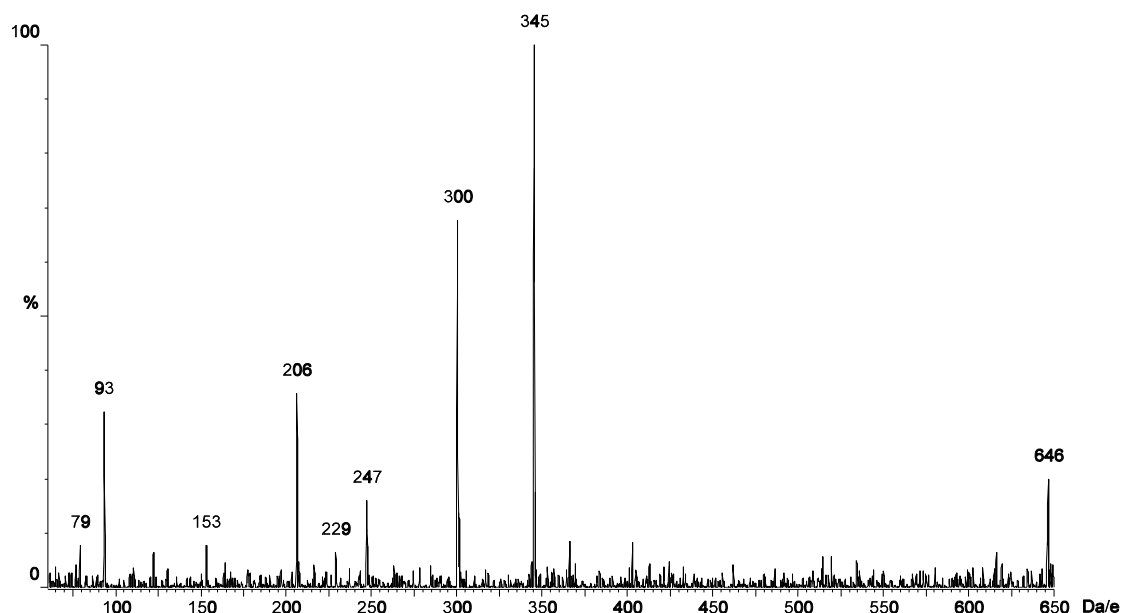
11. (M-H)⁻ m/z 227

IV.4.2.1. Di-adduct van guanine met PGE, $t_m = 12.9$ min.

Dit adduct kan gevormd worden door reactie van PGE met twee nucleofiele plaatsen op de guaninebase. De eerste alkylering vindt hoogstwaarschijnlijk plaats op de N-7, wat de meest reactieve plaats is (Van den Eeckhout, 1991; Vanhoutte et al., 1995; Vanhoutte et al., 1996). Een tweede, minder reactieve, alkyleringsplaats werd door Van den Eeckhout (1991), met behulp van NMR en UV-spectrometrie, toegewezen aan het N² atoom. Het is dan ook hoogstwaarschijnlijk dat dit guanineadduct gealkyleerd is op het N-7 en het N² atoom. De oorsprong van dit adduct is het optreden van een depurinatiereactie door solvolyse. Hierbij zijn twee mogelijkheden: ofwel ondergaat het reeds gevormde base-digealkyleerde dGMP solvolyse, ofwel ondergaat dGMP solvolyse waarna vervolgens het vrijgekomen guanine tweemaal gealkyleerd wordt met PGE. Hoogstwaarschijnlijk vinden beide reacties plaats.

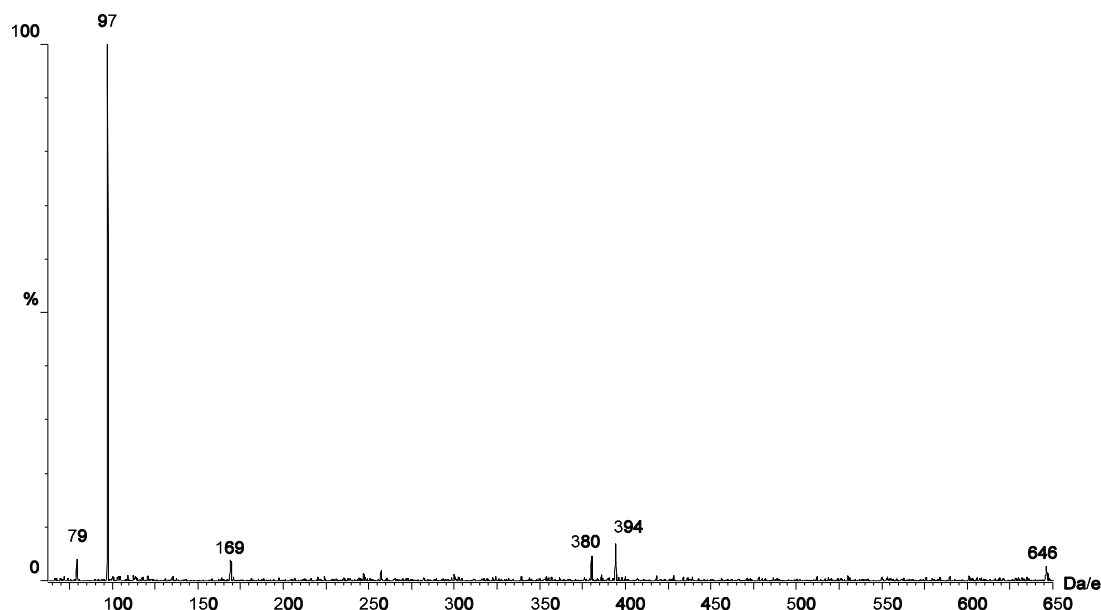
IV.4.2.2. Di-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 15.7$ min.

De structuur van dit product werd bepaald door het opnemen van het CZE-ES-MS/MS-spectrum (figuur 4.18) van (M-H)⁺ bij m/z 646 en met $t_m = 15.7$ min. De belangrijkste diagnostische fragmenten hebben m/z waarden bij: 93, 206, 247, 300 en 345. Het fragmentatieschema voor dit adduct is weergegeven in figuur 4.7. Het production bij m/z 345 dat overeenstemt met de gealkyleerde suikerfosfaatgroep, ontstaat door 1,2-eliminatie (McLuckey en Habibi-Goudarzi, 1993) van de glycosidische binding. Daardoor ontstaat ook het ion bij m/z 300 wat toegewezen kan worden aan de gealkyleerde base. De alkylering bevindt zich hoogstwaarschijnlijk op de N-7, wat de meest reactieve plaats is (Van den Eeckhout, 1991; Vanhoutte et al., 1995; Vanhoutte et al., 1996). De fragmentionen bij m/z 247 en 345 vormen voldoende bewijs voor de aanwezigheid van PGE-alkylering op de fosfaatgroep. Het fragment bij m/z 206 dat ontstaat door verlies van de fenolgroep uit het production bij m/z 300, bewijst de aanwezigheid van een PGE-alkylatie op de basegroep. We kunnen dus besluiten dat dit di-adduct van PGE één modificatie draagt op de N-7 van de guaninebase en één modificatie op de fosfaatgroep.



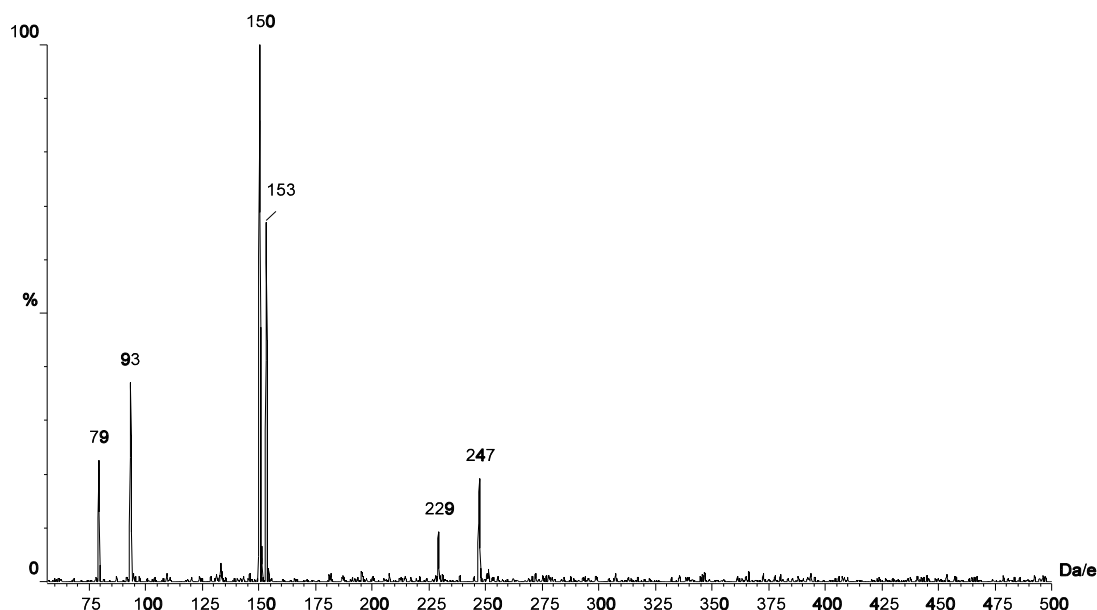
IV.4.2.3. Di-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 17.2$ min.

Het CZE-ES-MS/MS-spectrum, bekomen voor het product met $(M-H)^-$ bij m/z 646 en met $t_m = 17.2$ min., bij een botsingsenergie van 25 eV is weinig informatief (zie figuur 4.19). Dit CID-geïnduceerde productionenspectrum kon niet verbeterd worden door de botsingsenergie te variëren (een gebied van 20 tot 30 eV werd getest). Het enige beduidende production dat aanwezig is (m/z 97) kan toegewezen worden aan defosforylatie van $(M-H)^-$. Dit wijst erop dat de fosfaatgroep vrij is en dus niet gealkyleerd is, wat impliceert dat de beide alkylaties aanwezig dienen te zijn op de basegroep. Identiek aan de redenering voor het di-adduct van guanine kunnen we verwachten dat de alkylaties hier op het N-7 en het N² atoom aanwezig zullen zijn.



IV.4.2.4. Mono-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 17.6$ min.

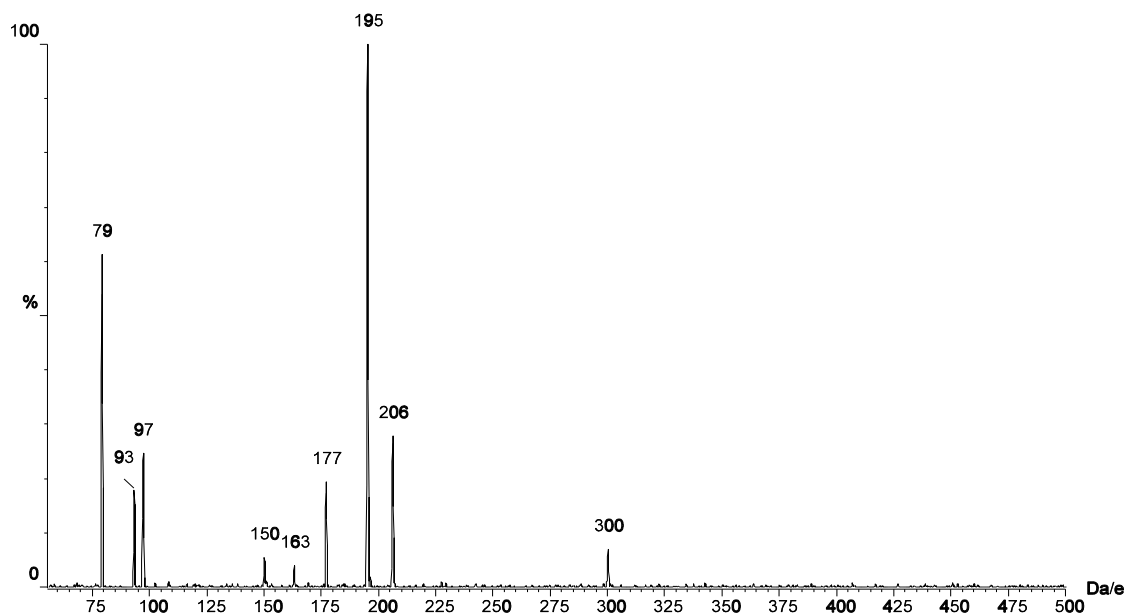
De structuur van het adduct met $(M-H)^-$ bij m/z 496 en $t_m = 17.6$ min. werd opgehelderd door het opnemen van zijn CZE-ES-MS/MS-spectrum (zie figuur 4.20). De belangrijkste diagnostische fragmentionen werden gedetecteerd bij m/z : 93, 150, 229 en 247. Het fragmentatieschema is weergegeven in figuur 4.7 in het gedeelte dat de fosfaatadducten bespreekt. De productionen bij m/z 247 (gealkyleerde fosfaatgroep) en 229 (dehydratatie van m/z 247) bewijzen de aanwezigheid van de PGE-alkylatie op de fosfaatgroep. Het fragment bij m/z 150 ontstaat door de splitsing van de glycosidische binding en is toe te wijzen aan de ongemodificeerde guaninebase. De aanwezigheid van deze fragmentionen laat ons toe om op ondubbelzinnige wijze de alkylatie te lokaliseren op de fosfaatgroep van het dGMP.



IV.4.2.5. Mono-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 19.4$ min.

Het CZE-ES-MS/MS-spectrum van de verbinding met $t_m = 19.4$ min. (zie figuur 4.21) vertoont de volgende fragmentionen die informatie verschaffen over de structuur van $(M-H)^-$ bij m/z 496: m/z 79, 97, 150, 163, 195, 206 en 300. De fragmentatieschema's zijn weergegeven in figuur 4.7 in het gedeelte van de base-adducten. Het meest intense production (m/z 195) kan toegewezen worden aan de suikerfosfaatgroep en ontstaat door 1,2-eliminatie (McLuckey en Habibi-Goudarzi, 1993) van de glycosidische binding, daarbij wordt eveneens het ion bij m/z 300 gevormd, wat overeenstemt met de gealkyleerde base. Deze alkylering bevindt zich hoogstwaarschijnlijk op de N-7 (Van den Eeckhout, 1991; Vanhoutte et al., 1995; Vanhoutte et al., 1996). Dit vermoeden wordt bevestigd door de aanwezigheid van het production bij m/z 163. Dit ion ontstaat uit het fragment bij m/z 206 (zie figuur 4.7) door verlies van $HNCO$ (afkomstig van de N-1 groep en de O^6 groep). Dit bewijst dat de alkylatie niet aanwezig is op de N-1 of de O^6 atomen (Vanhoutte et al., 1995b). De aanwezigheid van het fragmention bij m/z 97, dat toegewezen kan worden aan de fosfaatgroep, bewijst dat de fosfaatgroep in dit adduct niet gealkyleerd is. Bemerk dat dit productionenspectrum totaal verschillend

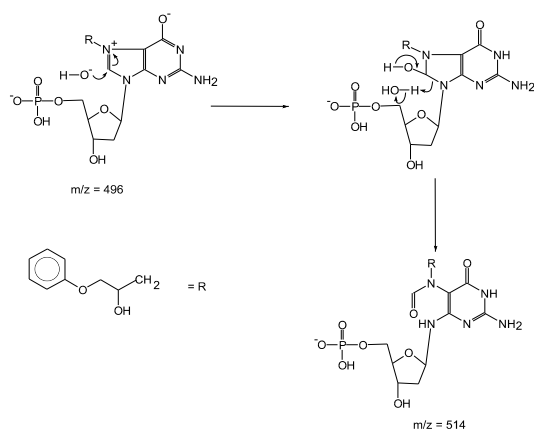
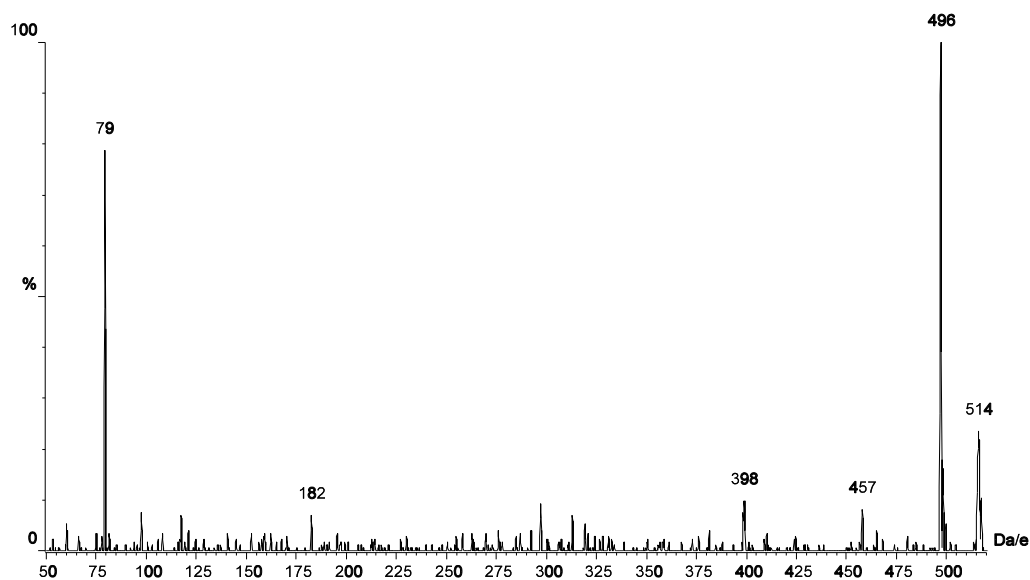
is van dit bekomen voor het fosfaat gealkyleerde dGMP. We kunnen dan ook besluiten dat de PGE-alkylatie in dit adduct aanwezig is op de N-7 van dGMP.



IV.4.2.6. Imidazoolring-geopend dGMP-PGE adduct, $t_m = 19.5$ min.

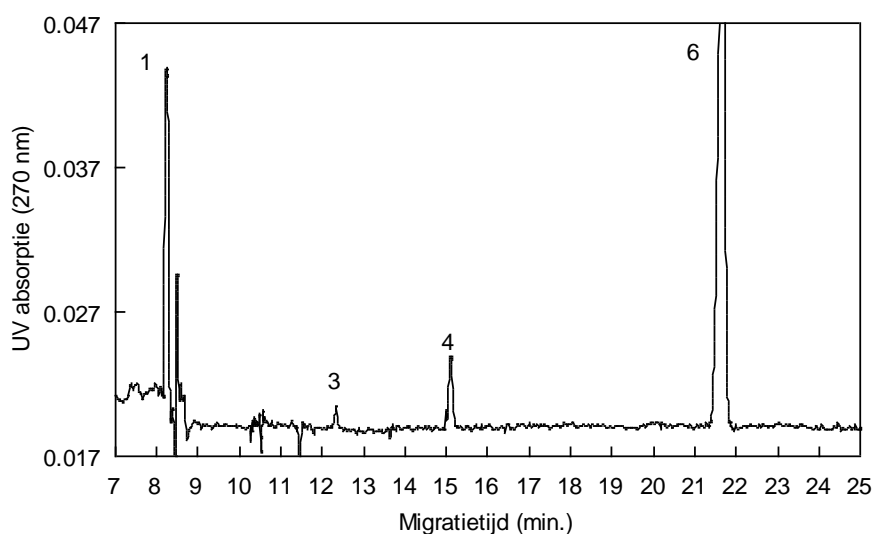
Het CZE-ES-MS/MS-spectrum bekomen voor de verbinding met (M-H)⁻ bij m/z 514 en met $t_m = 19.5$ min., bij een botsingsenergie van 16 eV is weinig informatief (zie figuur 4.22). Variatie van botsingsenergie (een gebied van 12 tot 25 eV werd getest) kon de fragmentatie niet verbeteren. De enige beduidende productionen hebben m/z waarden bij: 79 en 496. Het fragment bij m/z 79 kan toegewezen worden aan de fosfietgroep, en het ion bij m/z 496 ontstaat door verlies van water uit (M-H)⁻. Aan de hand van dit productionenspectrum kan de structuur van deze verbinding niet achterhaald worden. Gebaseerd op zijn molecuulmassa (515 Da) en zijn migratiegedrag (co-migratie met het N-7 gealkyleerde dGMP) werd verondersteld dat deze component het imidazoolring-geopende product is. Deze verbinding kan gemakkelijk gevormd worden uit het N-7 gealkyleerde dGMP volgens het hieronder beschreven reactiemechanisme (figuur 4.23) (Van den Eeckhout, 1991; Vanhoutte et al., 1995). De aanwezigheid van dit imidazoolring-geopende

adduct is een bijkomend bewijs om de alkylation op het co-migrerende dGMP-adduct toe te wijzen aan de N-7 positie.

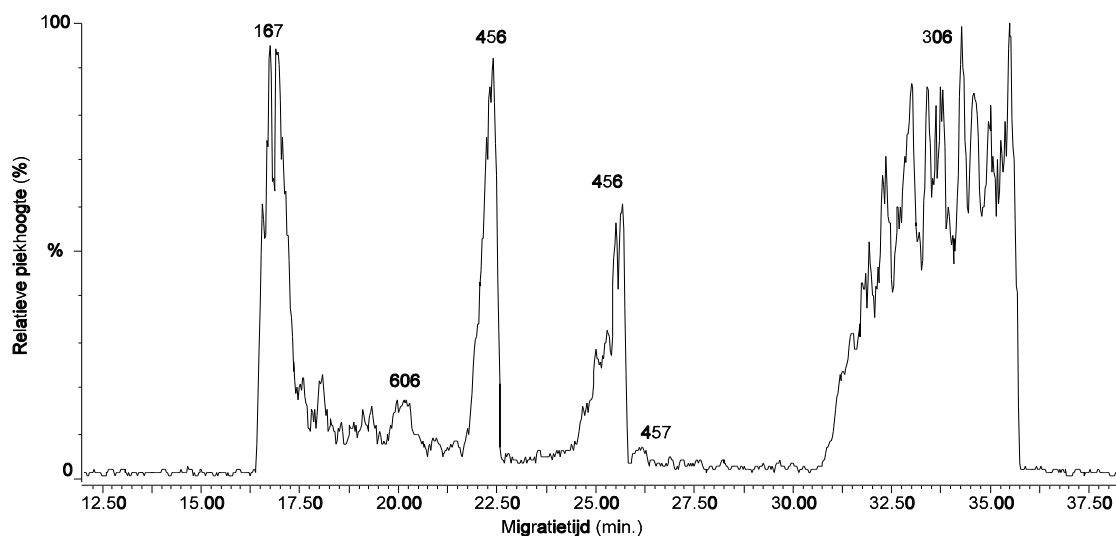


IV.4.3. Adducten van dCMP met PGE

Analyse van het reactiemengsel van dCMP met PGE (zie Hoofdstuk IV.3.2) met behulp van CZE (condities zie Hoofdstuk IV.3.3) geeft het elektroferogram weergegeven in figuur 4.24.



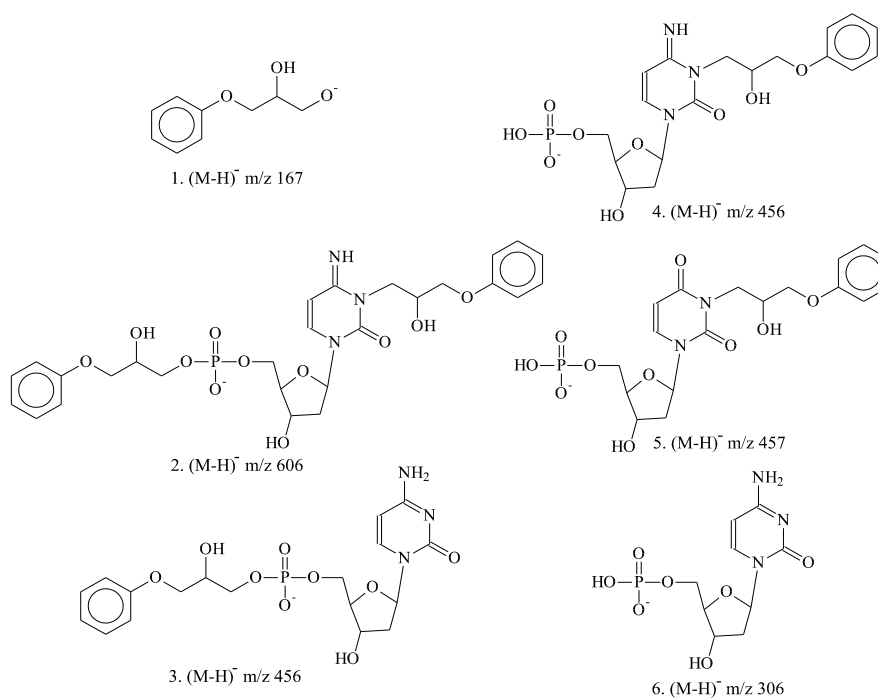
Uit dit elektroferogram blijkt dat PGE eveneens reageert met het dCMP-nucleotide. De nucleotidepiek (6) in dit elektroferogram werd geïdentificeerd door vergelijking van de migratietijden met de migratietijd van ongewijzigd dCMP. Alle pieken in dit elektroferogram werden geïdentificeerd met behulp van CZE-ES-MS en CZE-ES-MS/MS. Het massa-elektroferogram van het reactiemengsel van dCMP met PGE vertoont de volgende m/z -waarden (zie figuur 4.25). Op basis van die $(M-H)^-$ -waarden konden de producten tentatief geïdentificeerd worden, zie tabel 4.3.



TABEL 4.3: Tentatieve karakterisering van de producten aanwezig in het dCMP-PGE reactiemengsel. De t_m waarden zijn deze bekomen na CZE-ES-MS-analyse.

piek	t_m (min)	m/z waarde (M-H) ⁻	tentatieve karakterisering
1	17.0	167	PGE-diol
2	20.2	606	di-adduct van dCMP met PGE
3	22.4	456	mono-adduct van dCMP met PGE
4	25.6	456	mono-adduct van dCMP met PGE
5	26.2	457	mono-adduct van dUMP met PGE
6	34.0	306	dCMP

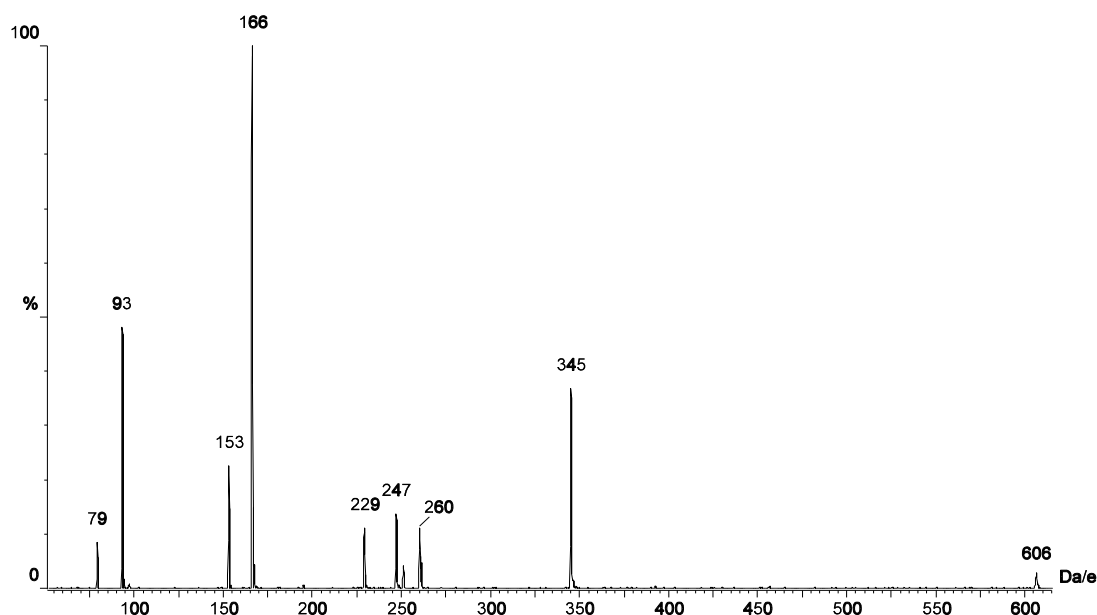
Het PGE-diol ($t_m = 17.0$ min.) ontstaat door hydrolyse van het epoxide. Om meer structurele informatie te bekomen werden, door middel van CZE-ES-MS/MS, de laag energetische CID-spectra opgenomen van de overige componenten. De structuur van deze producten wordt weergegeven in figuur 4.26.



IV.4.3.1. Di-adduct van dCMP met PGE, $t_m = 20.2$ min.

De structuur van dit adduct werd bepaald door het opnemen van het CZE-ES-MS/MS-spectrum (figuur 4.27) van het product met (M-H)⁻ bij m/z 606 en

met $t_m = 20.2$ min. De belangrijkste diagnostische fragmentionen hebben m/z waarden bij: 93, 166, 247, 260 en 345.

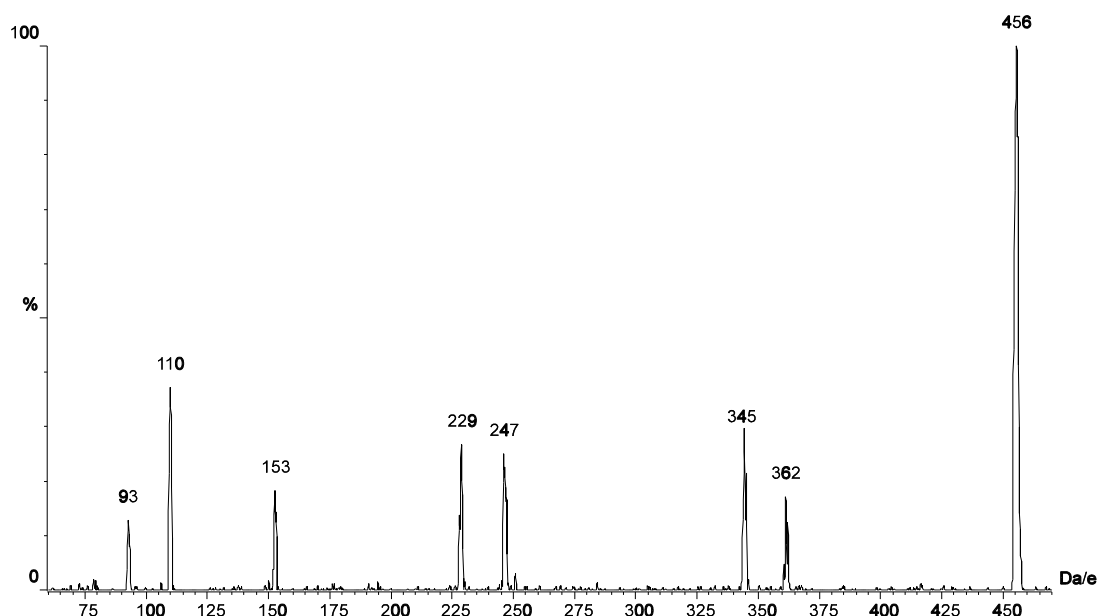


Het fragmentatieschema voor dit spectrum is weergegeven in figuur 4.7. Het production bij m/z 345 dat toegewezen kan worden aan de gealkyleerde suikerfosfaatgroep, ontstaat door 1,2-eliminatie van de glycosidische binding (McLuckey en Habibi-Goudarzi, 1993). Daarbij wordt ook het ion bij m/z 260 gevormd wat overeenstemt met de gealkyleerde base. Alhoewel dit spectrum geen van de fragmentionen vertoont die specifiek zijn voor N-3 alkylatie (m/z 183) of N⁴ alkylatie (m/z 243 of 42) zoals deze wel bekomen werden na ES in de negatieve mode van de nucleoside adducten (Van den Eeckhout, 1991; Lemière et al., 1996), kunnen we toch stellen dat de alkylatie hier hoogstwaarschijnlijk aanwezig is op de N-3 positie, daar een studie van de adductvorming van dCMP met BPADGE (Vanhoutte et al., 1996) uitwees dat de alkylatie aanwezig was op de N-3 positie. Het fragment bij m/z 166 dat ontstaat uit het ion bij m/z 260 door verlies van de fenolgroep, bewijst de aanwezigheid van een PGE-alkylatie op de basegroep. De productionen bij m/z 247 en 345 vormen voldoende bewijs voor de aanwezigheid

van PGE-alkylering op de fosfaatgroep. We kunnen dus besluiten dat dit di-adduct van PGE één modificatie draagt op de N-3 van de cytidinebase en één modificatie op de fosfaatgroep.

IV.4.3.2. Mono-adduct van dCMP met PGE, $t_m = 22.4$ min.

De structuur van het adduct met $(M-H)^-$ m/z 456 en $t_m = 22.4$ min. werd opgehelderd door het opnemen van zijn CZE-ES-MS/MS-spectrum (figuur 4.28). De belangrijkste diagnostische fragmentionen werden gedetecteerd bij m/z : 93, 110, 247, 345 en 362.

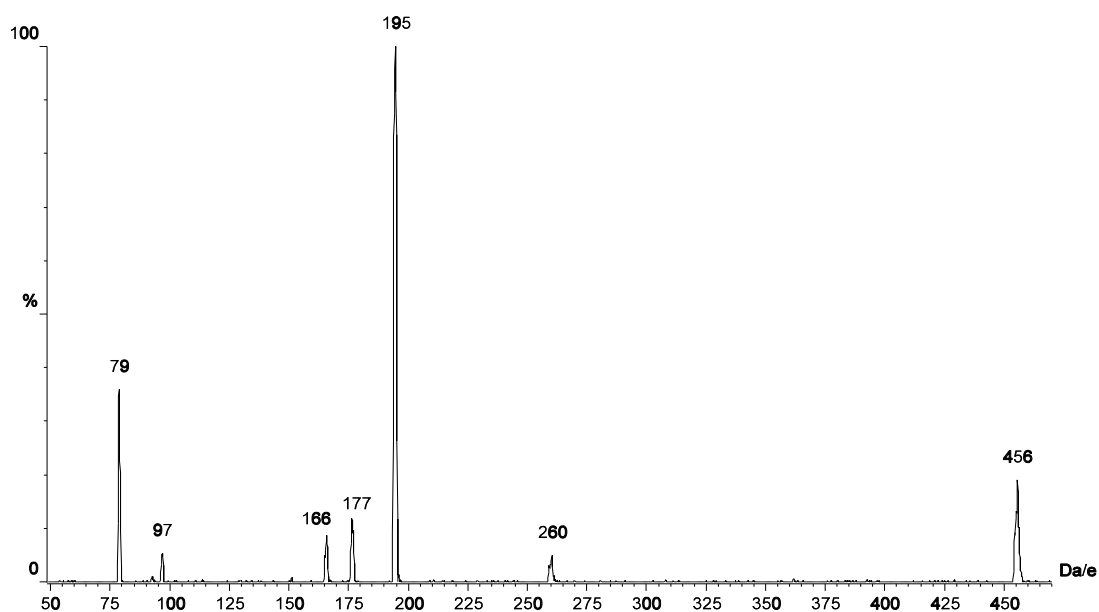


Een mogelijk fragmentatieschema is weergegeven in figuur 4.7 in het gedeelte handelend over de fosfaatadducten, met uitzondering van het production bij m/z 362 verklaart dit schema de teruggevonden fragmentionen. Het ion bij m/z 362 ontstaat uit $(M-H)^-$ (bij m/z 456) door het verlies van de fenolgroep van de PGE-alkylatie. Het fragment bij m/z 345, is evenals bij de di-adduct, afkomstig van de gealkyleerde suikerfosfaatgroep, net als de ionen bij m/z 247 (gealkyleerde fosfaatgroep) en 229 (dehydratatie van m/z 247). Het fragmention bij m/z 110 ontstaat door splitsing van de glycosidische binding en is toe te wijzen aan de ongemodificeerde cytidinebase.

De aanwezigheid van deze productionen levert afdoende bewijs om te besluiten dat de PGE-alkylering aanwezig is op de fosfaatgroep van het dCMP.

IV.4.3.3. Mono-adduct van dCMP met PGE, $t_m = 25.6$ min.

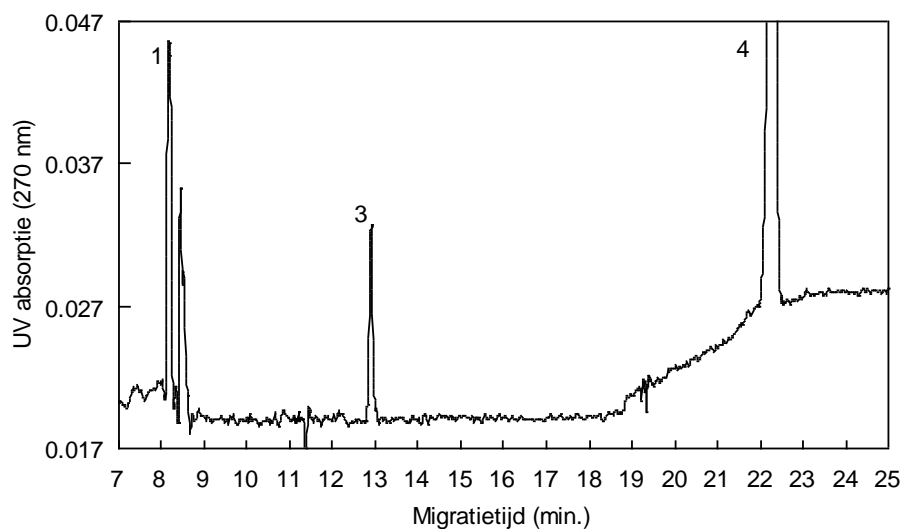
Het CZE-ES-MS/MS-spectrum van de verbinding met $t_m = 25.6$ min. (zie figuur 4.29) vertoont de volgende fragmentionen die informatie verschaffen over de structuur van $(M-H)^-$ bij m/z 456: m/z 79, 97, 166, 195 en 260. De fragmentatieschema's zijn weergegeven in figuur 4.7 in het gedeelte handelend over de baseadducten.



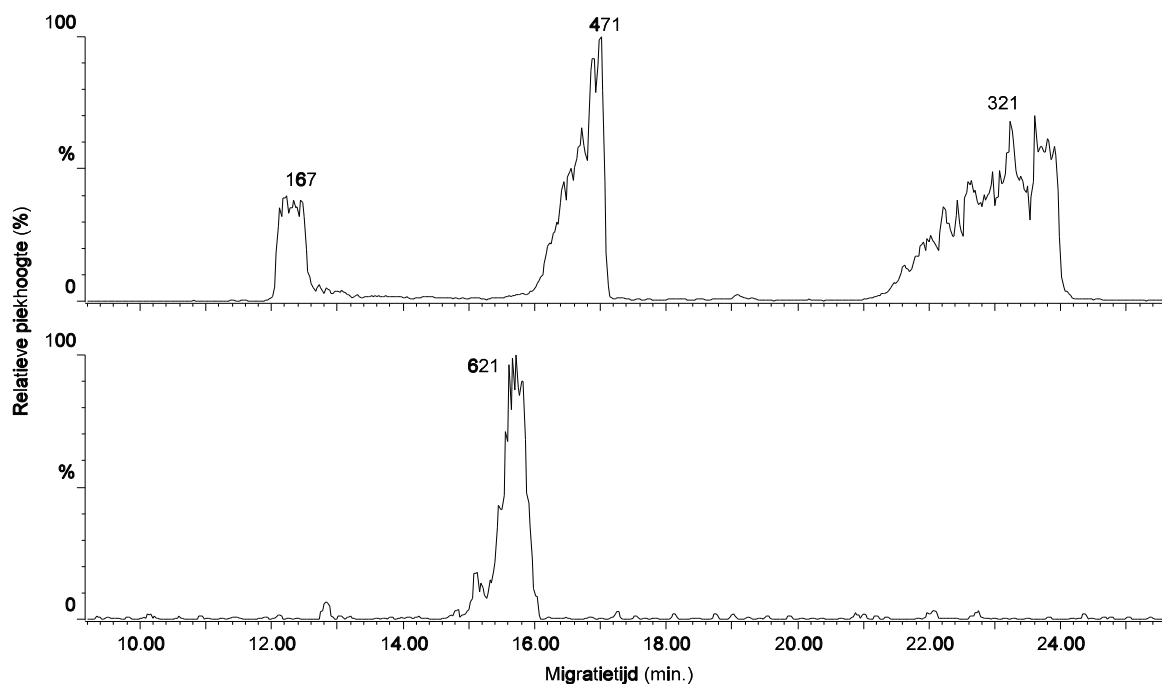
Het meest intense production (m/z 195) kan toegewezen worden aan de suikerfosfaatgroep en ontstaat door 1,2-eliminatie (McLuckey en Habibi-Goudarzi, 1993) van de glycosidische binding, daarbij wordt eveneens het ion bij m/z 260 gevormd, wat overeenstemt met de gealkyleerde base. Het fragmentation bij m/z 166 ontstaat uit dit ion door het verlies van de fenolgroep van de PGE-adduct. Dezelfde redenering volgend als voor het hiervoor beschreven di-adduct kunnen we de alkylering lokaliseren op de N-3, alhoewel de productionen specifiek voor N-3 alkylatie (m/z 183) of N^4 alkylatie (m/z 243 of m/z 42), ook hier niet aanwezig zijn. Het fragment bij m/z 97, dat overeenstemt met de fosfaatgroep, toont aan dat deze groep niet gemodificeerd is. Dit spectrum is sterk verschillend van het productionenspectrum bekomen voor het fosfaatgealkyleerde dCMP. De alkylering kan dan ook met zekerheid gelokaliseerd worden op de cytidinebase van het dCMP en hoogstwaarschijnlijk op de N-3.

IV.4.3.4. Mono-adduct van dUMP met PGE, $t_m = 26.2$ min.

De structuur van deze verbinding werd bepaald door het opnemen van het CZE-ES-MS/MS-spectrum (figuur 4.30) van $(M-H)^-$ bij m/z 457 en met $t_m = 26.2$ min. De belangrijkste diagnostische fragmentionen hebben m/z waarden bij: 79, 97, 195 en 261. De fragmentatieschema's zijn weergegeven in figuur 4.7 in het gedeelte van de baseadducten. Bemerkt de grote gelijkenis tussen dit productionenspectrum en het spectrum bekomen voor het base-gealkyleerde dCMP. De enige verschillen zijn de lagere intensiteit van het spectrum, wat te wijten is aan het feit dat dit adduct in een veel lagere concentratie voorkomt in het dCMP-PGE reactiemengsel. Bovendien is er de aanwezigheid van de ionen bij m/z 261 en 457 die één massa eenheid hoger zijn dan voor het dCMP-adduct. Dit adduct werd geïdentificeerd als het N-3 gealkyleerde dUMP. Een studie van Lemière et al. (1993 en 1996) toonde aan dat de N-3 PGE-adduct van dCyd omgezet wordt in het overeenkomstige dUrd-adduct ten gevolge van een hydrolytische deaminatiereactie. Deze studie toonde ook aan dat de alkyleringsplaats op het uridine het N-3 atoom is. Deze hydrolytische deaminatiereactie (figuur 4.31) is, gezien de lage piekintensiteit (figuur

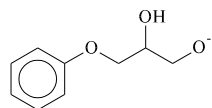


Uit dit elektroferogram blijkt dat PGE slechts in geringe mate reageert met het TMP-nucleotide. De nucleotidepiek (4) in dit elektroferogram werd geïdentificeerd door vergelijking van de migratietijden met de migratietijd van ongewijzigd TMP. De pieken in dit elektroferogram werden geïdentificeerd met behulp van CZE-ES-MS- en CZE-ES-MS/MS-analyse. Het massa-elektroferogram van het reactiemengsel van TMP en PGE vertoont de volgende m/z -waarden (zie figuur 4.33). Op basis van de bekomen $(M-H)^-$ -waarden konden de verbindingen tentatief geïdentificeerd worden, zie tabel 4.4. Om meer structurele informatie te bekomen werden, door middel van CZE-ES-MS/MS, de laag energetische CID-spectra opgenomen van de beide adducten aanwezig in het TMP-PGE reactiemengsel. De structuur van deze producten wordt weergegeven in figuur 4.34.

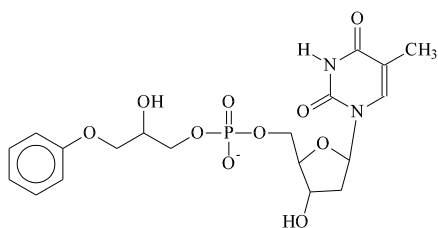


TABEL 4.4: Tentatieve karakterisering van de producten aanwezig in het TMP-PGE reactiemengsel. De t_m waarden zijn deze bekomen na CZE-ES-MS-analyse.

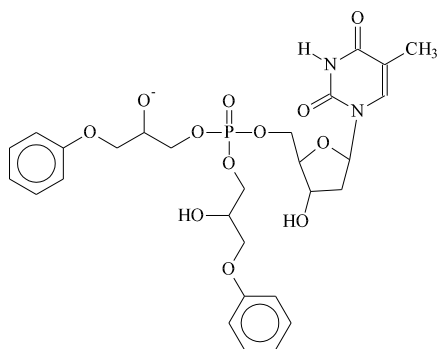
piek	t_m (min)	m/z waarde (M-H) ⁻	tentatieve karakterisering
1	12.4	167	PGE-diol
2	15.8	621	di-adduct van TMP met PGE
3	17.0	471	mono-adduct van TMP met PGE
4	23.0	321	TMP



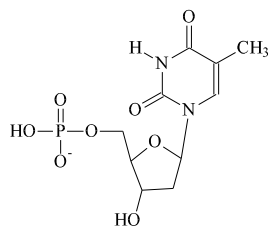
1. (M-H)⁻ m/z 167



3. (M-H)⁻ m/z 471



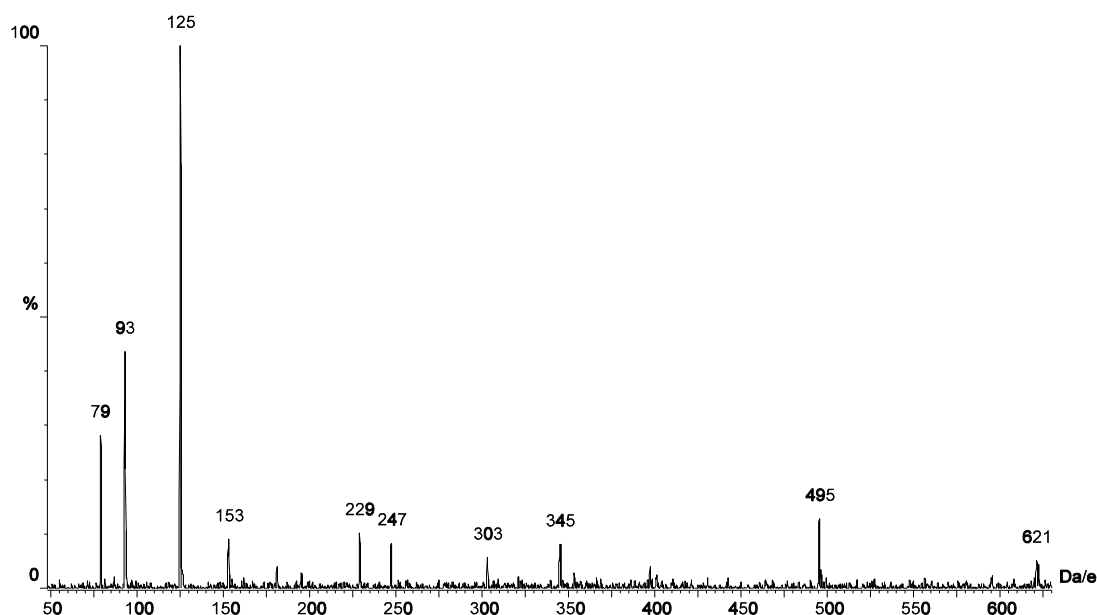
2. (M-H)⁻ m/z 621

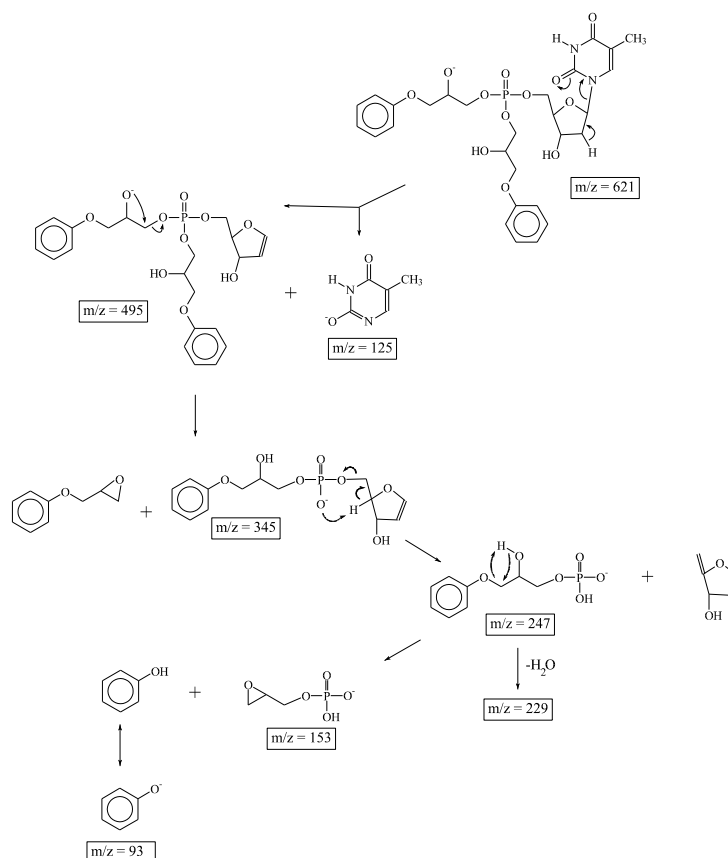


4. (M-H)⁻ m/z 321

IV.4.4.1. Di-adduct van TMP met PGE, $t_m = 15.8$ min.

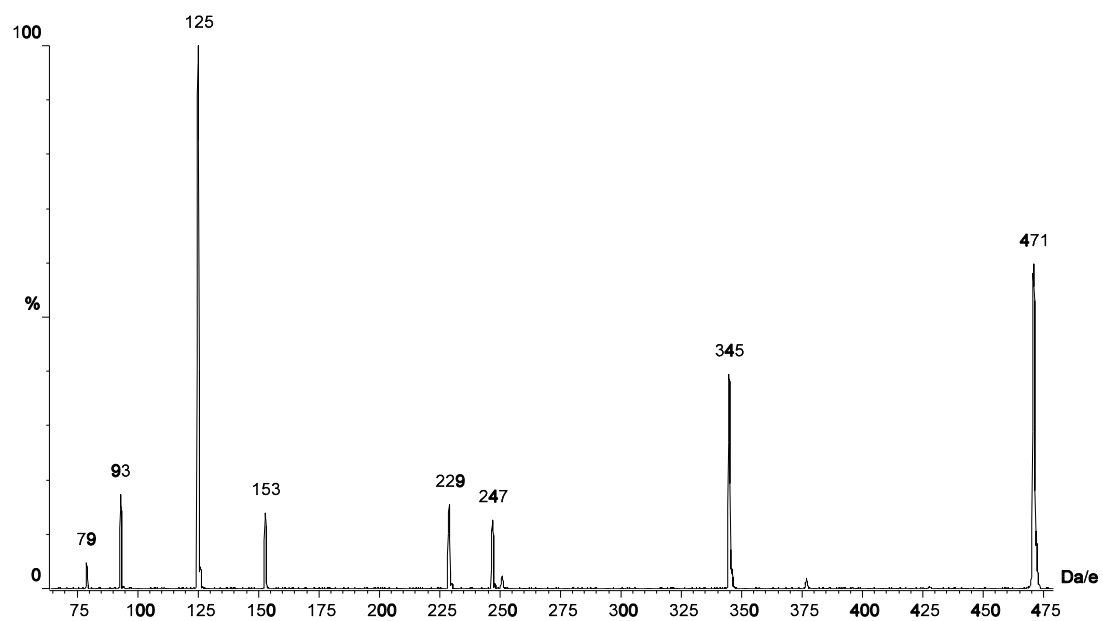
De structuur van dit adduct werd bepaald door het opnemen van het CZE-ES-MS/MS-spectrum (figuur 4.35) van $(M-H)^-$ bij m/z 621 en $t_m = 15.8$ min. De belangrijkste diagnostische fragmenten werden gedetecteerd bij m/z : 93, 125, 247, 345 en 495. Dit di-adduct is afwijkend van structuur van de di-adducten van de overige nucleotiden. Zijn fragmentatieschema is weergegeven in figuur 4.36. Het production bij m/z 125 dat kan worden toegewezen aan de ongewijzigde thyminebase, ontstaat door 1,2-eliminatie van de glycosidische binding (McLuckey en Habibi-Goudarzi, 1993). Daarbij wordt ook het fragmenten bij m/z 495 gevormd wat overeenstemt met een gedialkyleerde suikerfosfaatgroep. Het zwakke signaal bij m/z 397 kan toegewezen worden aan een gedialkyleerde fosfaatgroep. Uit de aanwezigheid van deze fragmenten kan besloten worden dat dit adduct tweemaal gemodificeerd is op de fosfaatgroep. Geen van de overige nucleotiden vertoont een dergelijk adduct.





IV.4.4.2. Mono-adduct van TMP met PGE, $t_m = 17.0$ min.

De structuur van het adduct met $(M-H)^-$ bij m/z 471 en $t_m = 17.0$ min. werd opgehelderd door het opnemen van zijn CZE-ES-MS/MS-spectrum (zie figuur 4.37). De belangrijkste diagnostische fragmentionen hebben m/z waarden bij: 93, 125, 247 en 345. Een mogelijk fragmentatieschema is weergegeven in figuur 4.7 in het gedeelte dat de fosfaatadducten bespreekt. Het production bij m/z 345, dat kan toegewezen worden aan de gealkyleerde suikerfosfaatgroep, ontstaat door 1,2-eliminatie van de glycosidische binding (McLucky en Habibi-Goudarzi, 1993). Daarbij wordt ook het ion bij m/z 125 gevormd wat overeenstemt met de ongemodificeerde thyminebase. Deze productionen en het fragmention bij m/z 247 leveren voldoende zekerheid om te besluiten dat de modificatie in dit adduct gelokaliseerd is op de fosfaatgroep.



IV.5. Besluit

De adducten gevormd tijdens de reactie van PGE met de 5'-monofosfaatnucleotiden werden geïdentificeerd dankzij het gebruik van CZE-ES-MS en CZE-ES-MS/MS. Van alle belangrijke adducten werden CID-productionenspectra opgenomen die als referentie kunnen dienen voor het verder onderzoek naar de interactie van PGE met kalfthymus DNA. Teneinde voldoende staal op het capillair te kunnen injecteren om CID-spectra op te nemen werd de in Hoofdstuk III ontwikkelde *on line* "sample stacking" toegepast.

Uit dit onderzoek blijkt dat, naast de gekende base-alkylaties (Van den Eeckhout, 1991; Van den Eeckhout et al., 1991; Lemière et al., 1993; Lemière et al., 1996), PGE ook aanleiding geeft tot de vorming van fosfaataalkylaties. Fosfaat-gealkyleerde adducten werden geïdentificeerd voor dAMP, dGMP, dCMP en TMP. Uit dit onderzoek blijkt bovendien dat PGE bij interactie met TMP enkel aanleiding geeft tot fosfaataalkylering. Naast de mono-gealkyleerde adducten werden ook di-gealkyleerde adducten evenals een aantal afbraakproducten geïdentificeerd.

Dergelijke fosfaataalkyleringen van PGE waren nog niet eerder beschreven, wel werd fosfaataalkylering geobserveerd na interactie van cyclofosfamide met DNA (Lindemann en Harbers, 1980; Lindemann, 1984; Maccubbin et al., 1991). Het aantonen van de vorming van dergelijke fosfaataalkylaties kan belangrijk zijn om de cytotoxische activiteit van een component te verklaren, zo werd aangetoond dat nitrosourem in RNA aanleiding geeft tot de vorming van fosfotriësters die leiden tot de degradatie van de RNA-structuur (Singer et al., 1975). Bovendien werd de hydrolyse van fosfotriësters gevormd na reactie van DNA met pyrrolo[1,2-a]benzimidazool aziridinyI quinones verantwoordelijk gesteld voor de waargenomen DNA-degradatie (Skibo en Schulz, 1993).

IV.6. Referenties

- Dizdaroglu M. Chemical Determination of Oxidative DNA Damage by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Method. Enzymol.* 1994, 234, 3-16.
- Hemminki K, and Lax M. Stability of 7-alkyldeoxyguanosines of trichloropropyleneoxide, epichlorohydrin and glycidol. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 1986, 59, 80-85.
- Lemièrè F, Esmans EL, Van Dongen W, Van den Eeckhout E and Van Onckelen H. Evaluation of liquid chromatography-thermospray mass spectrometry in the determination of some phenylglycidyl ether-2'-deoxynucleoside adducts. *J. Chromatogr. A.* 1993, 647, 211-218.
- Lemièrè F, Joos P, Vanhoutte K, Esmans EL, De Groot A, Claeys M and Van den Eeckhout E. Phenylglycidyl ether adducts of 2'-deoxycytidine and 2'-deoxyadenosine: Stability in solution and structure analysis by electrospray tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1996, 7, 682-691.
- Lindemann H and Harbers E. In vitro reaktion der drei alkylierenden pharmaka cyclophosphamid, ifosfamid und trofosfamid mit DNS und DNS bausteinen. *Drug Res.* 1980, 30, 2075-2080.
- Lindemann H. Interaction of cyclophosphamide with DNA in isolated rat liver nuclei. *Anticancer Res.* 1984, 4, 53-58.
- Maccubbin AE, Caballes L, Riordan JM, Huang DH and Gurtoo HI. A cyclophosphamide/DNA phosphoester adduct formed in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 1991, 51, 886-892.
- McLuckey SA and Habibi-Goudarzi. Decompositions of multiply charged oligonucleotide anions. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 12085.
- Singer B, Sun L and Fraenkel-Conrat A. Effects of alkylation of phosphodiester and of bases on infectivity and stability of Tobacco mosaic virus RNA phosphate alkylated TMV RNA. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975, 72, 2232-2236.
- Skibo EB and Schulz WG. Pyrrolo[1,2-a]benzimidazole-based aziridiny quinones. A new class of DNA cleaving agent exhibiting G and A base specificity. *J. Med. Chem.* 1993, 36, 3050-3055.

- Van den Eeckhout EG. Development of analytical methodology in the structure-genotoxicity relationship of some aliphatic epoxides. Proefschrift voorgelegd tot het verkrijgen van de graad van Geaggregeerde voor het Hoger Onderwijs in de Farmaceutische Wetenschappen. Universiteit Gent. 1991.
- Van den Eeckhout D, Coene J, Claereboudt J, Borremans F, Claeys M, Esmans E and Sinsheimer JE. Comparison of the isolation of adducts of 2'-deoxycytidine and 2'-deoxyguanosine with phenylglycidyl ether by high-performance liquid chromatography on a reversed-phase column and a polystyrene-divinylbenzene column. J. Chromatogr. A. 1991, 341, 317-331.
- Vanhoutte K, Joos P, Lemière F, Van Dongen W, Esmans EL, Claeys M and Van den Eeckhout E. Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry of the DNA adducts formed between 2'-deoxynucleosides and bisphenol A diglycidyl ether. J. Mass Spectrom. 1995, 30, 1453-1461.
- Vanhoutte K, Joos P, Lemière F, Van Dongen W and Esmans E. Comparison of conventional and capillary electrospray liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the detection of 2'-deoxynucleoside-bisphenol A diglycidyl ether adducts. J. Mass Spectrom. and Rapid Commun. Mass Sp. 1995b, S143-S152.
- Vanhoutte K, Van Dongen W, Esmans EL, Van den Eeckhout E and Van Onckelen H. A strategy for the identification of 2'-deoxynucleoside and 2'-deoxynucleotide adducts using electrospray tandem mass spectrometry. Eur. Mass Spectrom. 1996, 2, 181-192.

Hoofdstuk V: Onderzoek van de interactie van PGE met DNA.

V.1. Literatuuroverzicht

V.1.1. Belang van de studie van mogelijke fosfaatalkylering.

Het leeuwendeel van het DNA-adductonderzoek spitst zich toe op de identificatie of het aantonen van base-alkyleringen (Dizdaroglu, 1994) en over het algemeen wordt aangenomen dat deze base-alkyleringen, vooral op de N-7 van guanine, verantwoordelijk zijn voor de cytotoxische, cytostatische of mutagene werking van de alkylerende agentia. Bij de aanvang van dit werk was het onderzoek naar fosfaatalkylering marginaal en dat is het nog steeds.

Fosfaatalkylering werd aangeduid als één van de belangrijkste reactieproducten gevormd bij de interactie van cyclofosfamide met DNA (Lindemann en Harbers, 1980; Lindemann, 1984; Maccubbin et al., 1991). Zij postuleren dat deze fosfaatalkyleringen hoogstwaarschijnlijk verantwoordelijk zijn voor, toch gedeeltelijk, de cytotoxische eigenschappen van cyclofosfamide. Fosfaatalkylering werd ook beschreven voor de nitrosoureas (Singer et al., 1975; Carter et al., 1988). Zo'n 65% van de totale alkylatie van RNA en DNA met ethylnitrosourea zijn fosfotriësters (Singer et al., 1975). Bovendien werd aangetoond dat er geen correlatie bestaat tussen tumorigenese in ratten en de hoeveelheid N-7 guanineadducten (Singer et al., 1975). Beide onderzoekers besluiten dat de gevormde fosfotriësters onstabiel zijn en leiden tot afbraak van de RNA- en DNA-structuur (Singer et al., 1975; Carter et al., 1988). Gebaseerd op deze gegevens besloten Carter et al. (1988) dat deze fosfaatalkylaties hoogstwaarschijnlijk een belangrijke rol spelen in de cytotoxiciteit en mutagenese veroorzaakt door deze verbindingen.

Conrad et al. beschreven in 1986 dat β -hydroxyethyl fosfotriësters heel onstabiel zijn en dat de hydrolyse ervan doorgaat bij 37°C door interne nucleofiele zuurstofsubstitutie aan het fosforatoom. Dergelijke hydrolyse leidt tot breuken in de DNA-streng. De cytotoxische activiteit van pyrrolo[1,2-a]benzimidazole aziridiny quinones werd ook verklaard door het optreden van DNA-breuken ten gevolge van fosfaataalkylatie gevolgd door hydrolyse van de gevormde fosfotriëster door interne nucleofiele substitutie aan het fosforatoom (Skibo en Schulz, 1993).

V.1.2. Enzymatische hydrolyse van DNA tot 5'-mononucleotiden

DNA kan gehydrolyseerd worden tot 5'-mononucleotiden gebruikmakend van het nuclease P_1 enzym, dit is een fosfodiësterase-enzym dat kwalitatief ongevoelig is voor de aard van de suiker en de base (Crain, 1990). Gezien dit een exonuclease is kan de efficiëntie van de hydrolyse met nuclease P_1 verbeterd worden door het DNA voorafgaandelijk tot kortere oligonucleotiden te hydrolyseren door incubatie met DNAasel. Dit is een endonuclease, dat op bepaalde plaatsen in het DNA knipt om zodoende kortere oligonucleotiden aan te maken. Dit enzym wordt door de meeste auteurs gebruikt voor het uitvoeren van DNA-hydrolyse (Norwood et al., 1993; Luo et al., 1994). Van het nuclease P_1 enzym is bekend dat het in geval van sterk gemodificeerde basen, door bijvoorbeeld adductvorming, aanleiding geeft tot onvolledige hydrolyse. Dit heeft als gevolg dat er in het DNA-hydrolysaat naast de 5'-mononucleotiden ook gemodificeerde dinucleotiden aanwezig kunnen zijn. Deze gemodificeerde dinucleotiden kunnen dan vervolgens gehydrolyseerd worden tot hun overeenkomstige 5'-mononucleotiden door incubatie met het "Snake Venom Phosphodiesterase" SVP-enzym. Dit SVP-enzym is minder gevoelig voor structurele modificaties dan het nuclease P_1 (Crain, 1990). Sommige auteurs maken na hydrolyse met DNAasel geen gebruik van het nuclease P_1 maar enkel van het SVP fosfodiësterase om de hydrolyse tot 5'-mononucleotiden te bekomen (Norwood et al., 1993). Het grote nadeel van deze aanpak is dat het SVP-enzym bekendstaat voor de aanwezigheid van deaminases (Luo et al., 1994) en dat de incubatie dus beter beperkt wordt gehouden. Daarom opteren de meeste auteurs voor een korte incubatie met SVP, enkel indien dit nodig is, na hydrolyse met nuclease P_1 (Crain,

1990; Luo et al., 1994). De aanwezigheid van deaminases geeft aanleiding tot de omzetting van dAMP in dIMP.

V.2. Inleiding

Het hoofddoel van dit onderdeel van het onderzoek was om met behulp van de reeds op punt gestelde CZE-scheiding en *on-line* CZE-ES-MS koppeling na te gaan welke adducten gevormd werden bij de reactie van PGE met kalfthymus DNA. Daartoe diende in eerste instantie een enzymatische DNA-hydrolyse te worden geoptimaliseerd om het kalfthymus DNA na interactie met PGE om te zetten in zijn 5'-monofosfaatnucleotide bouwstenen en hun eventuele adducten. Gezien de hydrolyse niet tot op het nucleoside niveau werd uitgevoerd gaan hierbij de eventuele fosfaatadducten niet verloren. Bij ons onderzoek werd speciaal aandacht besteed aan het onderzoek naar mogelijke fosfaat-alkylering, daar bij de interactie van PGE met de 5'-monofosfaatnucleotiden bepaald werd dat een belangrijk aandeel van de adducten gealkyleerd zijn op de fosfaatgroep (zie Hoofdstuk IV).

Een tweede doelstelling van dit onderzoek bestond erin na te gaan wat de invloed was van de interactie van PGE met kalfthymus DNA op de integriteit van de DNA-streng. Met behulp van de CZE-analysemethode en de CZE-ES-MS koppeling werd nagegaan of er tijdens de incubatie van DNA met PGE afbraakproducten werden gevormd. Daartoe werd het supernatans van de reactiemengsels na DNA-precipitatie onderzocht op de aanwezigheid van PGE-adducten.

Bovendien was het de bedoeling om de identiteit van alle teruggevonden adducten en afbraakproducten te bepalen door het opnemen van CID-productionenspectra met behulp van CZE-ES-MS/MS. Deze spectra konden vervolgens vergeleken worden met de referentiespectra bekomen in Hoofdstuk IV.

V.3. Materiaal en methoden

V.3.1. Chemicaliën

DNA type I van kalfthymus, deoxyribonuclease I (DNAase I, EC. 3.1.21.1), nuclease P₁ (EC. 3.1.30.1), "Phosphodiesterase I, type V van *Bothrops atrox* Venom" (SVP) (EC. 3.1.4.1), methanol, isopropanol en ammoniumcarbonaat waren van Sigma (St. Louis, MO, VS). Een tweede bron van het SVP-enzym was "Phosphodiesterase I van *Crotalus adamanteus* Venom" van Pharmacia Biotech (Uppsala, Zweden) evenals agarose NA, speciaal opgezuiverd voor elektroforese van nucleïnezuren, en de 100 basepaar-ladder. Dit laatste enzym was behandeld om de 5'-nucleotidase activiteit te verwijderen. (±)-2,3-epoxypropylfenylether (PGE) was van Aldrich (Steinheim, Duitsland). Chromabond HR-P ("Solid-Phase-Extraction") SPE-kolommen (500 mg bedvolume) waren van Machery-Nagel (Düren, Duitsland). Het water was van HPLC-kwaliteit en werd bekomen door zuivering van gedesoniseerd water met het Milli-Q Reagent Grade waterzuiveringssysteem (Millipore, Bedford, MA, VS). Het water gezuiverd met dit systeem voldeed ruim aan alle ISO3696/BS3978 standaarden voor graad-I-zuiverheid en bezat een weerstand van 18.2 MΩ.cm. Alle gebruikte chemicaliën waren van *pro analysi* kwaliteit.

V.3.2. Incubatie van DNA met PGE

Om microbiële contaminatie te vermijden werden alle manipulaties uitgevoerd in een LAF-kast. Het HPLC-water, alle glaswerk, plastic- en andere recipiënten werden voor gebruik geautoclaveerd. Alle buffers en niet-autoclaveerbare oplossingen werden onderworpen aan filtersterilisatie (0.22 µm poriën steriele celluloseacetaat-spuutfilters van Roth, Karlsruhe, Duitsland).

De invloed van de incubatieduur van PGE met DNA werd nagegaan door kalfthymus DNA gedurende verschillende tijdsintervallen met PGE te incuberen. Daartoe werden reeksen van 1 ml kalfthymus DNA (10 mg/ml in water) gedurende verschillende tijdsintervallen (15 min., 5 u., 10 u., 24 u. en 48 u.) geïncubeerd in gesloten reageerbuizen bij 37 °C onder licht schudden met 2 ml van een 0.5 M

methanolische PGE-oplossing (vers bereid). Een controlestaal (1 ml DNA oplossing in 2 ml methanol) werd eveneens bereid (48 uur bij 37°C). De reacties werden beëindigd door de methanol in te dampen onder een stroom stikstofgas. Aan de overblijvende vloeistof werd 1 ml HPLC-water toegevoegd en na goed mengen werd dit mengsel drie keer geëxtraheerd met 3 ml chloroform. Heel opmerkelijk is dat de viscositeit van de oorspronkelijke DNA-oplossing bij de stalen die gedurende 10 uur, of langer, met PGE werden geïncubeerd verloren is gegaan. Gezien dit er kon op wijzen dat het DNA afgebroken wordt, werden aliquots van deze stalen genomen en na 1/10 verdunning in water werd 1 µl van deze stalen geladen op een agarose-slab-gel.

Daarna werd het DNA en de gevormde oligonucleotides, in de stalen na extractie met chloroform, geprecipiteerd met ethanol (finale concentratie van 70% ethanol en 0.3 M natriumacetaat). Het ethanolisch supernatans werd droog gedampt onder een stroom van stikstofgas en het residu werd opgelost in 500 µl HPLC-water. Deze stalen werden vervolgens onderworpen aan de opzuiveringsprocedure op de HR-P kolommen (zie Hoofdstuk II.3.7). Dit was noodzakelijk om de hoge concentratie natriumacetaat die in het supernatans aanwezig was na DNA-precipitatie te verwijderen. Een dergelijk hoge elektrolytconcentratie maakt het gebruik van “sample stacking” onmogelijk (Chien en Burgi, 1992). Na elutie werden de stalen drooggedampt en opgelost in 100 µl HPLC water. Deze stalen werden vervolgens geanalyseerd met CZE, met CZE-ES-MS en CZE-ES-MS/MS.

De oligonucleotide pellets, bekomen na DNA-precipitatie werden vervolgens onderworpen aan de enzymatische hydrolyse. Daartoe werden ze opgelost in 1 ml digestiebuffer bestaande uit 20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 50 µM CaCl₂ en 2.25 mM MgCl₂ waarna de stalen, na toevoegen, van 500 U DNAasel gedurende 12 uur geïncubeerd werden bij 37°C. Vervolgens werd 20 µl 1 M natriumacetaat toegevoegd en 5 U nuclease P₁ en werd de incubatie bij 37°C nog 6 uur verdergezet. Deze stalen werden vervolgens geanalyseerd met CZE, met CZE-ES-MS en CZE-ES-MS/MS. Voor de identificatie van de adducten aanwezig in het DNA-hydrolysaat met CZE-ES-MS/MS werden 200 µl aliquots van het DNA hydrolysaat na 48 uur incubatie onderworpen aan de opzuiveringsprocedure op de

HR-P kolommen (zie Hoofdstuk II.3.7).

V.3.3. Agarosegelelektroforese

Teneinde de integriteit van de DNA-molecule na te gaan na reactie met PGE werd 1 μ l van de reactiemengsels genomen of 1 μ l van een vers bereide kalfthymus DNA-oplossing (10 mg/ml). Na verdunnen in HPLC-water (1/10), werd aan 1 μ l van de verdunning 9 μ l HPLC-water en 1 μ l ladingsbuffer toegevoegd. Dit staal werd dan geladen op een 1% agarosegel. De ladingsbuffer bestond uit 0.25% broomfenolblauw, 0.25% xyleencyanol en 30% glycerol in water. De gel werd bereid met, en gelopen in, 1X TBE-elektroforesebuffer (45 mM Tris-boraat, 1 mM EDTA, pH 8.3). Aan de agarosegel werd voor het stollen eveneens 0.5 μ g/ml ethidiumbromide toegevoegd, evenals aan de loopbuffer. Het DNA werd gescheiden op de 1% agarosegel door een spanning van 10 V/cm aan te leggen gedurende 1 uur. De 100-basepaar ladder werd geladen als referentie voor de lengte van de bekomen DNA-banden. Na elektroforese werd de gel gevisualiseerd en gefotografeerd door belichting met UV-licht, waarbij het in het DNA geïntercaleerde ethidiumbromide oplicht door fluorescentie.

V.3.4. Analyse van de reactiemengsels met CZE

De CZE-analyses werden uitgevoerd met de in Hoofdstuk II op punt gestelde analyseparameters. Het capillair met een i.d. van 75 μ m had een totale lengte van 92.5 cm en de afstand tussen het injectie-uiteinde en de UV-detector bedroeg 61.5 cm. UV-detectie werd uitgevoerd bij een golflengte van 270 nm. Het capillair werd gethermostatiseerd bij 30°C. Als elektroforesebuffer werd een ammoniumcarbonaatbuffer (pH 9.68) met een concentratie van 100 mM aangewend. De stalen werden geconcentreerd op het capillair door het uitvoeren van de in Hoofdstuk II beschreven “sample stacking”-procedure na injectie bij 120 mbar gedurende 0.22 min. Na deze “sample stacking” werd de elektroforese gestart door het aanbrengen van een spanningsverschil van 17 kV over het capillair.

V.3.5. Analyse van de reactiemengsels met CZE-ES-MS

De CZE-ES-MS metingen werden alle uitgevoerd op de “triple-quadrupool”-massaspectrometer (VG Quattro II triple-quadrupole, Micromass, Manchester, Engeland). De CZE-ES-MS-methodologie werd uitgebreid beschreven in Hoofdstuk III alwaar de *on-line* koppeling op punt werd gesteld. De metingen werden uitgevoerd gebruik makende van de in Hoofdstuk III geoptimaliseerde omstandigheden. Voor de experimenten op het supernatans werd een massagebied van 75 Da tot 800 Da gescand aan een snelheid van 725 Da/sec en voor de experimenten op de DNA-hydrolysaten werd een massagebied van 75 Da tot 900 Da gescand aan een snelheid van 550 Da/sec. De “sheath”-vloeistof, 80/20 isopropanol/2.5 mM ammoniumcarbonaat (pH 9.68), had een debiet van 7 μ l/min. Op het “sheath”-vloeistofcapillair werd een elektrospayspanning van -4.5kV aangelegd, op de “skimmer cone” werd een spanning van +30 V aangelegd en elektroforese werd uitgevoerd bij 13 kV met een additionele druk van 10 mbar over het capillair tijdens de elektroforese. De CZE-ES-MS massa-elektroferogrammen werden bekomen na het uitvoeren van de “sample stacking”-procedure zoals beschreven in Hoofdstuk III.3.4 na injectie van de stalen bij 100 mbar gedurende 0.8 min.

V.3.6. Analyse van de reactiemengsels met CZE-ES-MS/MS

Teneinde meer structurele informatie te bekomen werden productionenspectra opgenomen (CZE-ES-MS/MS), zoals beschreven in Hoofdstuk III.3.2. Daarbij werd de eerste quadrupool groep gebruikt om een gewenst moederion te selecteren, dat vervolgens in de botsingsgascel gefragmenteerd werd. De botsingsenergie werd, afhankelijk van het product, geoptimaliseerd tussen 15 en 33 eV bij een Argon gasdruk van 3×10^{-3} mbar. Teneinde voldoende staal op het capillair te kunnen injecteren om CZE-ES-MS/MS mogelijk te maken werd de “sample stacking”-techniek gebruikt zoals beschreven in Hoofdstuk III.3.4. De hoeveelheid staal die hierbij geïnjecteerd werd was afhankelijk van de concentratie van het desbetreffende adduct in het reactiemengsel. Alle CZE-ES-MS/MS experimenten werden uitgevoerd in de negatieve elektropray mode.

V.4. Resultaten en bespreking

V.4.1. Optimalisatie van de enzymatische hydrolyse

Teneinde de enzymatische hydrolyse te optimaliseren werd gebruikgemaakt van een verse stockoplossing van kalfthymus DNA (10 mg/ml) in steriel HPLC-water. Deze stockoplossing werd volledig gelijkaardig behandeld als de DNA-PGE reactiemengsels teneinde als volwaardige blanco te kunnen dienst doen. Daarom werden vervolgens 250 μ l aliquots onderworpen aan DNA-precipitatie door het toevoegen van ethanol, tot een finale concentratie van 70 % en 0.3 M natriumacetaat, pH 5.2. Na 1 uur incubatie bij -20°C werden deze stalen gedurende 15 minuten gecentrifugeerd bij 12000 g en 0°C . Na verwijderen van het ethanolisch supernatans werd de DNA-pellet opgelost in de buffer nodig voor de DNA-hydrolyse. In de literatuur worden voornamelijk twee enzymen gebruikt voor hydrolyse van DNA tot het 5'-mononucleotide niveau, enerzijds nuclease P_1 en anderzijds SVP (Crain, 1990; Luo et al., 1994). Voor beide enzymen werd een protocol geoptimaliseerd voor de hydrolyse van DNA.

V.4.1.1. Nuclease P_1 hydrolyse

Gebaseerd op de literatuurgegevens werd ervoor geopteerd om een DNA-hydrolyseprotocol op punt te stellen dat gebruikmaakt van de twee enzymen DNAasel en nuclease P_1 . Het gebruikte protocol is gebaseerd op dit gepubliceerd door Luo et al. (1994). De DNA-pellet werd opgelost in 1 ml buffer (20 mM Tris/HCL (pH 7.5), 50 μ M CaCl_2 en 2.25 mM MgCl_2) en 500 U DNAasel werden toegevoegd. Na 12 uur incubatie bij 37°C werd 20 μ l 1 M natriumacetaat en 5 U nuclease P_1 toegevoegd en werd de incubatie bij 37°C nog 6 uur verdergezet. Uit analyse van het elektroferogram bekomen na analyse van dit DNA-hydrolysaat blijkt dat de hydrolyse volledig is en dat de gewenste 5'-mononucleotiden gevormd werden.

V.4.1.2. SVP-hydrolyse

Een eerste geteste protocol was gebaseerd op Norwood et al. (1993) en maakte gebruik van achtereenvolgens DNAasel (200 U, 6 uur bij 37°C) en SVP

(0.001 U, 6 uur bij 37°C). Dit gaf niet de gewenste resultaten. Inspectie van het elektroferogram bekomen na CZE-analyse leerde ons dat de hydrolyse niet de gewenste 5'-mononucleotiden opleverde. De bekomen producten vertoonden hetzelfde migratiegedrag als de nucleosiden. We konden dan ook besluiten dat het SVP-enzym gecontamineerd was met een enzym dat aanleiding gaf tot het verwijderen van de 5'-fosfaatgroep. Deze contaminant was dus niet het in de literatuur beschreven deaminase, maar wel een 5'-nucleotidase. Het tot hertoe gebruikte enzym was afkomstig van Sigma.

Een tweede SVP-enzyme werd aangekocht van Pharmacia Biotech. Van dit enzyme was de 5'-nucleotidase activiteit verwijderd. De activiteit van dit enzyme werd nagegaan door de DNA-pellet na oplossen in 1 ml buffer (20 mM Tris/HCL (pH 7.5), 50 μ M CaCl₂ en 2.25 mM MgCl₂) achtereenvolgens te incuberen met 200 U DNAasel (6 uur bij 37°C) en 0.03 U van het SVP-enzyme van Pharmacia Biotech (2 uur bij 37°C). Uit analyse van het elektroferogram bekomen na analyse van dit DNA-hydrolysaat blijkt dat de hydrolyse volledig is en dat de gewenste 5'-mononucleotiden gevormd werden. Bovendien werden hier geen nucleosiden teruggevonden, waaruit we kunnen besluiten dat dit SVP-enzyme wel bruikbaar is voor hydrolyse van DNA tot zijn 5'-monofosfaatnucleotiden.

Het finaal protocol dat uitgewerkt werd om eventuele onvolledige hydrolyseproducten aanwezig na behandeling van gemodificeerd DNA met nuclease P₁ zoals beschreven in Hoofdstuk V.4.1.1 verder te hydrolyseren luidt als volgt: aan 200 μ l van het DNA-hydrolysaat bekomen na nuclease P₁ hydrolyse, zoals beschreven in Hoofdstuk V.4.1.1 werd 8 μ l ammoniumhydroxide (1M) toegevoegd om de pH op 8.0 te brengen en 0.005 U van het SVP-enzyme van Pharmacia Biotech en werd nog 2 uur geïncubeerd bij 37°C.

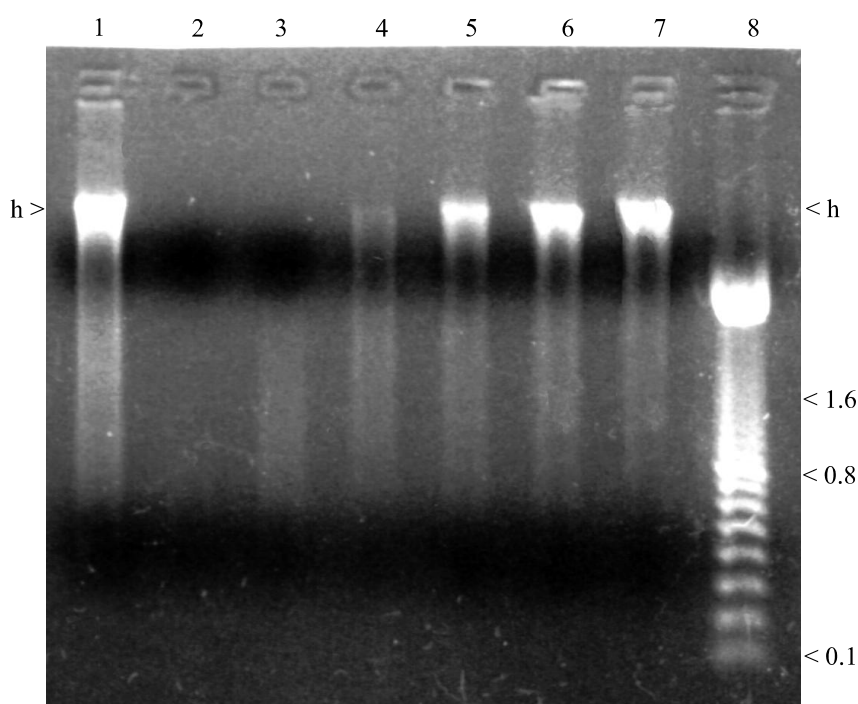
V.4.2. Invloed van de incubatieduur

V.4.2.1. Analyse op agarosegel

Uit analyse op agarosegel (figuur 5.1) van de DNA-stalen na verschillende incubatietijden bleek duidelijk dat de intensiteit van de hoogmoleculairgewichts-band, die overeenstemt met intact DNA, afnam naarmate de incubatie met PGE verlengd werd (zie lanen 2 tot 6). Na vijf uur incubatie met PGE was de intensiteit van deze band ongeveer gehalveerd (laan 5) en na tien uur incubatie is deze zo goed als verdwenen. Dit impliceert dat na tien uur bijna alle hoogmoleculairgewichts-DNA is afgebroken tot kortere oligonucleotiden. Vermits geen afbraak gedetecteerd werd in het DNA na 48 uur incubatie met methanol was het zo goed als zeker dat reactie met PGE verantwoordelijk was voor het verlies van de integriteit van de DNA-streng. Het is ook duidelijk uit deze resultaten dat de DNA-hydrolyse heel intensief is en het is dan ook meer dan waarschijnlijk dat de afbraak van het DNA een belangrijke rol speelt in de cytotoxiciteit van PGE.

Eerder in dit hoofdstuk werd reeds aangetoond dat PGE aanleiding gaf tot de vorming van adducten op de fosfaatgroepen van de 5'-monofosfaatnucleotiden. We gingen er dan ook van uit dat alkylering van de fosfaat-ruggengraat van het DNA verantwoordelijk was voor de geobserveerde degradatie van het DNA. Alhoewel de meeste van de bekende fosfotriëster-adducten in DNA stabiel zijn (Bannon en Verly, 1972) en zelfs genoemd worden als de meest stabiele DNA-modificaties (Saris et al., 1995), rapporteerden reeds verschillende onderzoekers het optreden van DNA-degradatie ten gevolge van fosfotriëstervorming (Skibo en Schulz, 1993). In het onderzoek van Conrad et al. (1986) werd de aanwezigheid van een hydroxylgroep in de β -positie op de fosfotriëster verantwoordelijk gesteld voor een snelle hydrolyse (bij 37°C) door interne nucleofiele zuurstofsubstitutiereactie op de fosfaatgroep. Aangezien PGE bij de binding met de fosfaatgroep ook aanleiding geeft tot een hydroxylgroep in de β -positie is het inderdaad aannemelijk dat fosfotriëstervorming van PGE en de daaropvolgende hydrolyse verantwoordelijk is voor het vormen van DNA-laesies. Verder onderzoek werd dan ook uitgevoerd om bewijzen voor dit hypothetisch

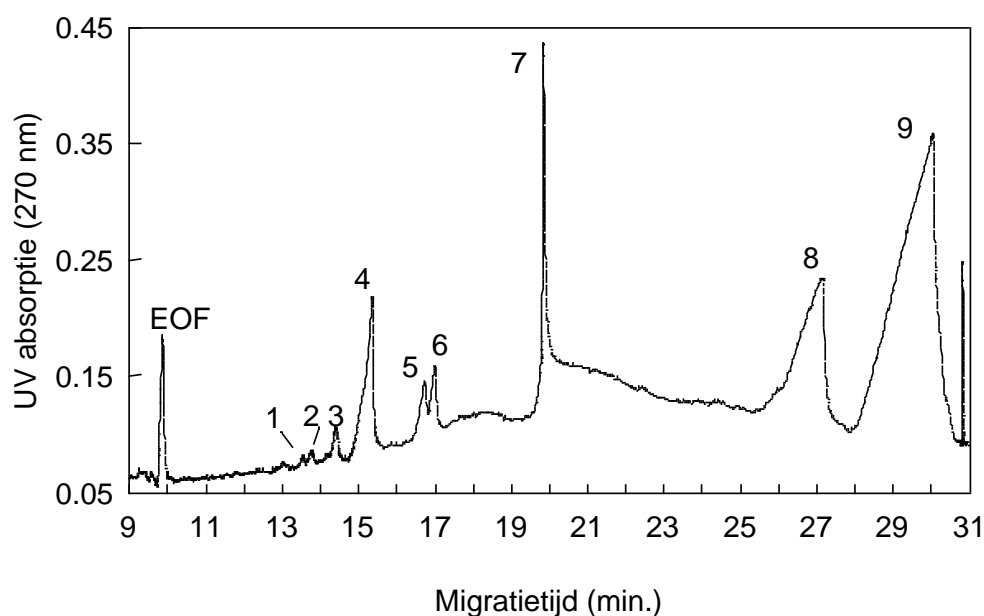
mechanisme te vinden.



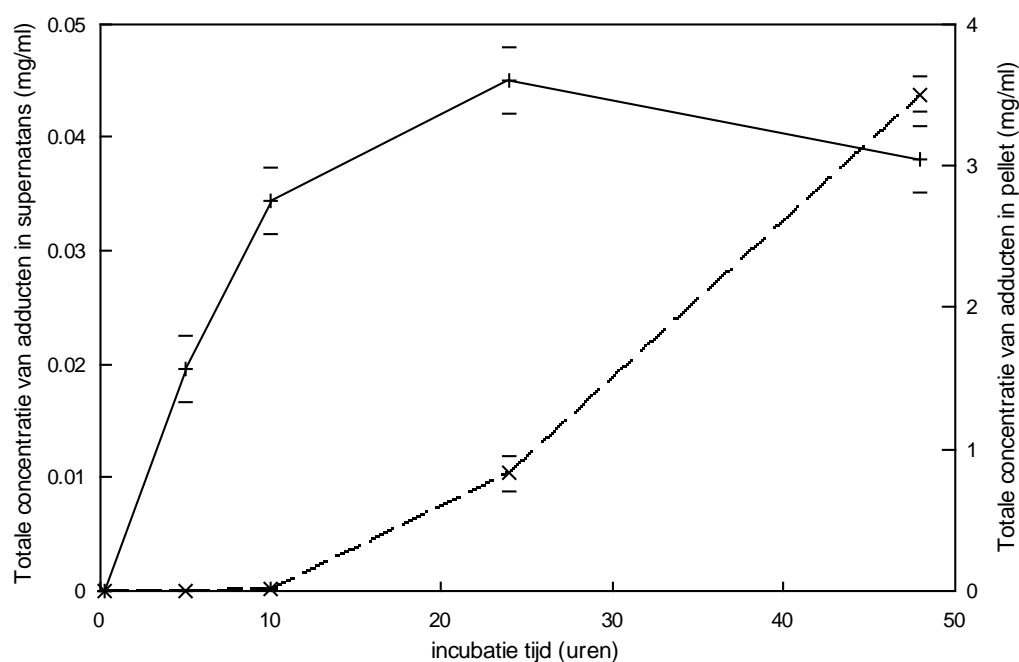
V.4.2.2. Analyse op CZE

CZE-analyse (condities zie Hoofdstuk V.3.4) werd uitgevoerd op de supernatansstalen en op de DNA-hydrolysaten bekomen na de verschillende incubatieperioden (zie Hoofdstuk V.3.2). De stalen werden geïnjecteerd gebruikmakende van de “sample stacking”-techniek (injectie 120 mbar gedurende 0.22 min.). In het elektroferogram (figuur 5.2) bekomen na analyse van het supernatans na 48 uur reactie werden een negental pieken gedetecteerd die alle afkomstig waren van de reactie van PGE met DNA. Het elektroferogram bekomen na analyse van het blanco reactiemengsel (48 uur incubatie in methanol) vertoonde geen pieken. In figuur 5.2 werden de volgende producten teruggevonden: piek 1 is het di-gealkyleerde dCMP; piek 2 is het dCMP gealkyleerd op de fosfaatgroep; piek 3 is de di-gealkyleerde fosfaatgroep; piek 4 is het gealkyleerd difosfaat met twee methoxygroepen; piek 5 is het gealkyleerd methoxy-fosfaatpiek 6 is het basegealkyleerde adduct van dAMP; pieken 7 en 8 zijn de mono-gealkyleerde fosfaatgroepen en piek 9 is het gealkyleerd difosfaat met één methoxygroep (zie ook

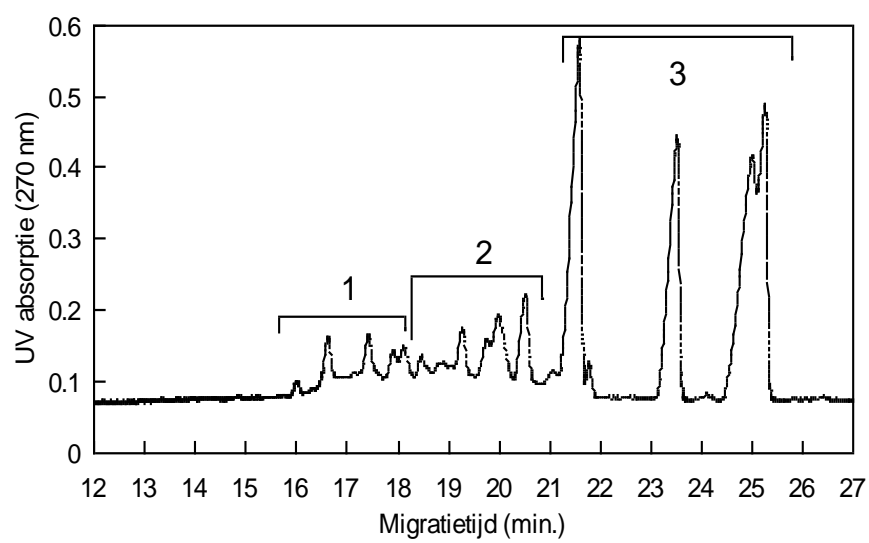
Hoofdstuk V.4.3)



Het basegealkyleerde adduct van dAMP (piek 6) was enkel aanwezig in de stalen die 48 uur geïncubeerd werden. Deze producten werden niet neergeslagen tijdens de DNA-precipitatie wat erop wijst dat het hier moleculen betrof met een laag moleculairgewicht die ontstaan waren door afbraakreacties van de DNA-streng. Gezien deze producten efficiënt werden weerhouden op de polystyreen-divinylbenzeen matrix van de SPE kolommen, rees het vermoeden dat het hier PGE-adducten betrof. Uit een semi-kwantitatieve analyse van de adducten aanwezig in het DNA-supernatans (figuur 5.3) bleek dat het overgrote deel van deze adducten gevormd werd gedurende de eerste tien uur van de incubatie. Na tien uur was er nog slechts een geringe toename in adductvorming. Deze semi-kwantitatieve bepaling was gebaseerd op de berekende oppervlaktes onder de curven van de desbetreffende adducten. Deze resultaten zijn in overeenstemming met de gegevens bekomen na agarosegelelektroforese, waaruit bleek dat nagenoeg alle hoogmoleculairgewicht-DNA gedegrademd was na 10 uur incubatie. Het is dan ook hoogstwaarschijnlijk dat de hier gevonden adducten de reactieproducten zijn, verantwoordelijk voor het verlies van de integriteit van de DNA-molecule.

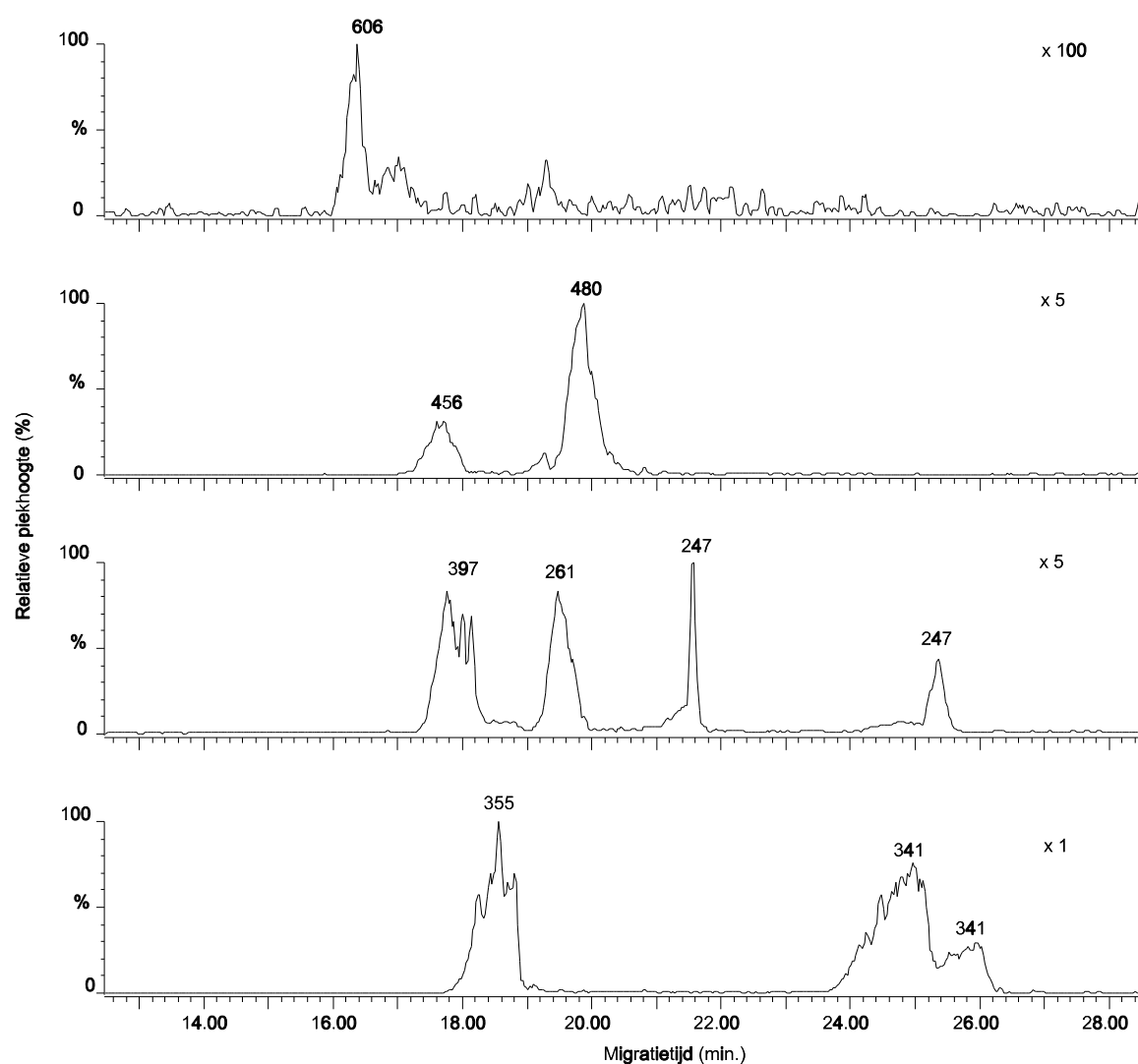


In het elektroferogram (figuur 5.4) van het enzymatische DNA-hydrolysaat van de pellet bekomen na 48 uur incubatie met PGE (zie Hoofdstuk V.3.2) was duidelijk een grote hoeveelheid adducten aanwezig. Het elektroferogram bekomen na analyse van het hydrolysaat van de blanco pellet (na 48 uur incubatie in methanol) vertoonde enkel de pieken van de ongemodificeerde 5'-mononucleotiden. Uit de semi-kwantitatieve analyse van de adducten teruggevonden in de enzymatische DNA-hydrolysaten (figuur 5.3) blijkt dat de vorming ervan slechts start na 10 uur incubatie, wat erop wijst dat deze adducten slechts gevormd worden na de degradatie van de DNA-molecule tot kortere oligonucleotiden. Ook hier is de semi-kwantitatieve bepaling gebaseerd op de berekende oppervlaktes onder de curven van de desbetreffende adducten.



V.4.3. Identificatie van DNA-PGE-adducten aanwezig in het supernatans

Gebruikmakend van CZE-ES-MS (figuur 5.5, condities zie Hoofdstuk V.3.5) werden de $(M-H)^-$ -ionen gezocht van de verbindingen aanwezig in het supernatans van de kalfthymus DNA-oplossing na 48 uur reactie met PGE (bereiding zie Hoofdstuk V.3.2). Op basis van hun m/z -waarde en hun migratiegedrag werden deze producten tentatief geïdentificeerd (tabel 5.1).

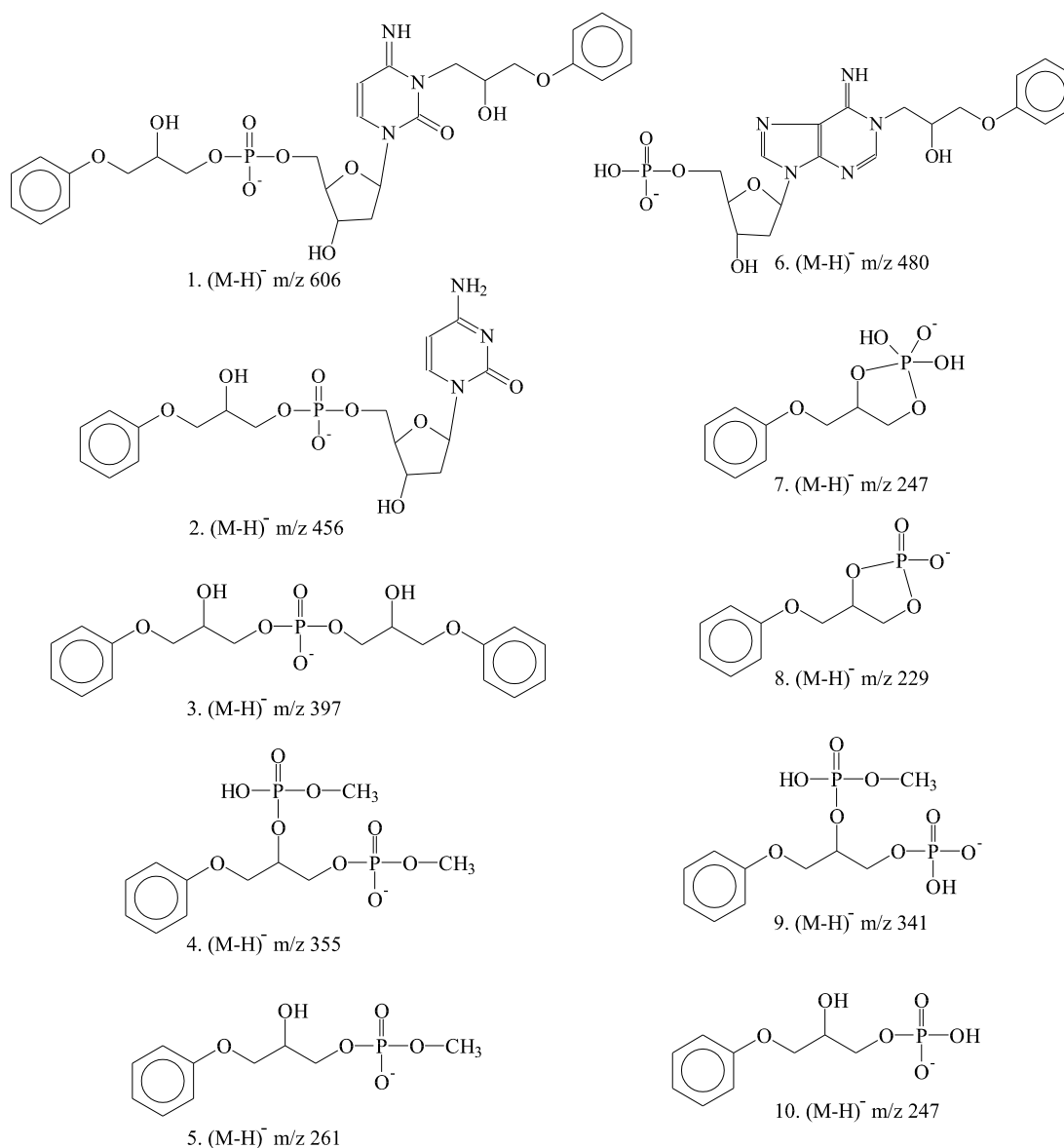


TABEL 5.1: Tentatieve karakterisering van de producten aanwezig in het supernatans van de kalfthymus DNA-oplossing na 48 uur incubatie met PGE (zie Hoofdstuk V.3.2).

m/z	t_m (min)	tentatieve karakterisering
-------	-------------	----------------------------

waarde (M-H) ⁻		
606	16.3	di-adduct van dCMP met PGE
456	17.7	mono-adduct van dCMP met PGE
397	17.9	di-gealkyleerd fosfaat
355	18.5	mono-gealkyleerd di-methoxy-difosfaat
261	19.5	mono-gealkyleerd methoxy-fosfaat
480	19.8	mono-adduct van dAMP met PGE
247	21.5	mono-gealkyleerd fosfaat
229	21.5	mono-gealkyleerd fosfaat (min water)
341	25.0	mono-gealkyleerd methoxy-difosfaat
247	25.4	mono-gealkyleerd fosfaat
341	25.9	mono-gealkyleerd methoxy-difosfaat

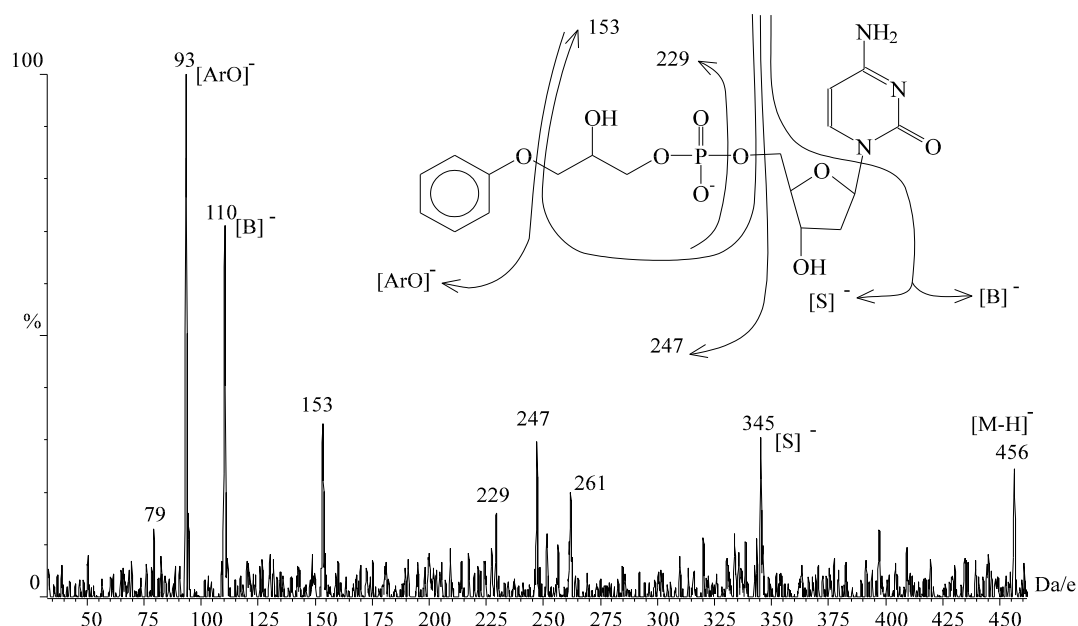
Van de component met m/z 606 kon gezien zijn te lage concentratie geen productionenspectrum opgenomen worden. Gezien zijn moleculaire massa en zijn migratietijd van 16.3 min. werd deze component, op basis van vergelijking met de referentie-adduct (zie Hoofdstuk IV.4.3.1), geïdentificeerd als het di-adduct van dCMP met één alkylering op de basegroep en één alkylering op de fosfaatgroep. Om meer structurele informatie te bekomen werden, door middel van CZE-ES-MS/MS, de laag energetische CID-spectra opgenomen van de overige componenten. De structuur van deze producten wordt weergegeven in figuur 5.6.



V.4.3.1. Mono-adduct van dCMP met PGE, $t_m = 17.7$ min.

De structuur van dit product werd bepaald door het opnemen van het CZE-ES-MS/MS-spectrum (figuur 5.7) van (M-H)⁻ 456 en met $t_m = 17.7$ min. De belangrijkste diagnostische fragmenten hebben m/z waarden bij: 93, 110, 247 en

345.

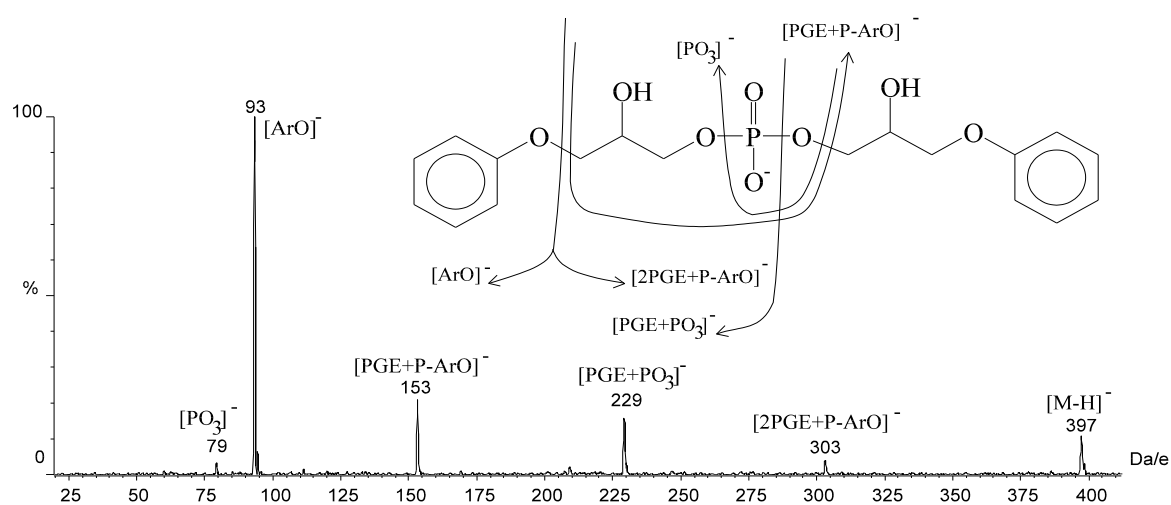


Dit productionenspectrum is nagenoeg identiek aan het spectrum bekomen voor het fosfaat-gealkyleerde dCMP-adduct bekomen na reactie van PGE met het afzonderlijke nucleotide. Het ion met m/z 345, afkomstig van de gealkyleerde suikerfosfaatgroep, evenals het ion met m/z 110, toe te wijzen aan het ongemodificeerde cytidinebase, ontstaat door 1,2-eliminatie (McLuckey en Habibi-Goudarzi, 1993) van de glycosidische binding. Een mogelijke fragmentatiereactie voor dit adduct is weergegeven in figuur 4.7 (zie Hoofdstuk IV) in het gedeelte van de fosfaatadducten. We kunnen dus besluiten dat deze component de fosfaatgealkyleerde PGE-adduct van dCMP is. Dit product wordt gevormd door alkylering van de fosfaatgroep in de DNA-streng, wat resulteert in de vorming van een fosfotriëster. Gezien de fosfotriëster in de β -positie van de PGE-alkylatie een hydroxylgroep draagt kan hij door interne nucleofiele zuurstofsubstitutie uit de DNA-streng hydrolyseren, dit in analogie met de β -hydroxyethyl fosfotriësters (Conrad et al., 1986), waarbij het hier teruggevonden adduct vrijkomt. De aanwezigheid van dit reactieproduct bewijst de hypothese van de vorming van een instabiele fosfotriëster met daarop volgende hydrolyse, waardoor de DNA-structuur

afgebroken wordt.

V.4.3.2. Di-gealkyleerd fosfaat, $t_m = 17.9$ min.

Het CZE-ES-MS/MS-spectrum van de adduct met $t_m = 17.9$ min. (figuur 5.8) vertoont de volgende fragmenten die informatie verschaffen over de structuur van $(M-H)^-$ m/z 397: m/z 79, 93, 153, 229 en 303. Een tentatief fragmentatieschema is weergegeven in figuur 5.8.

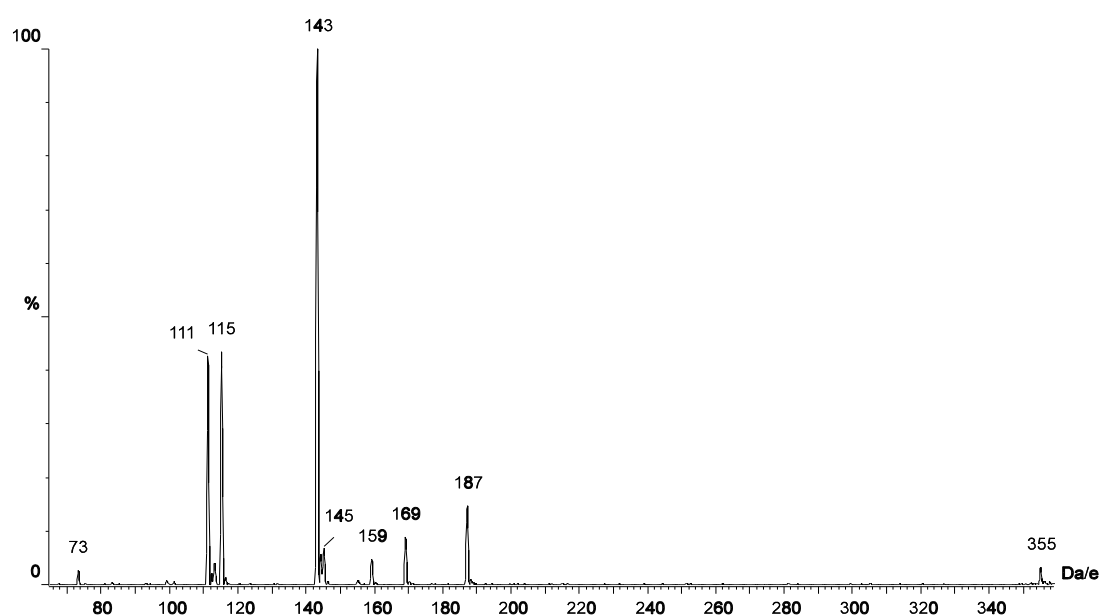


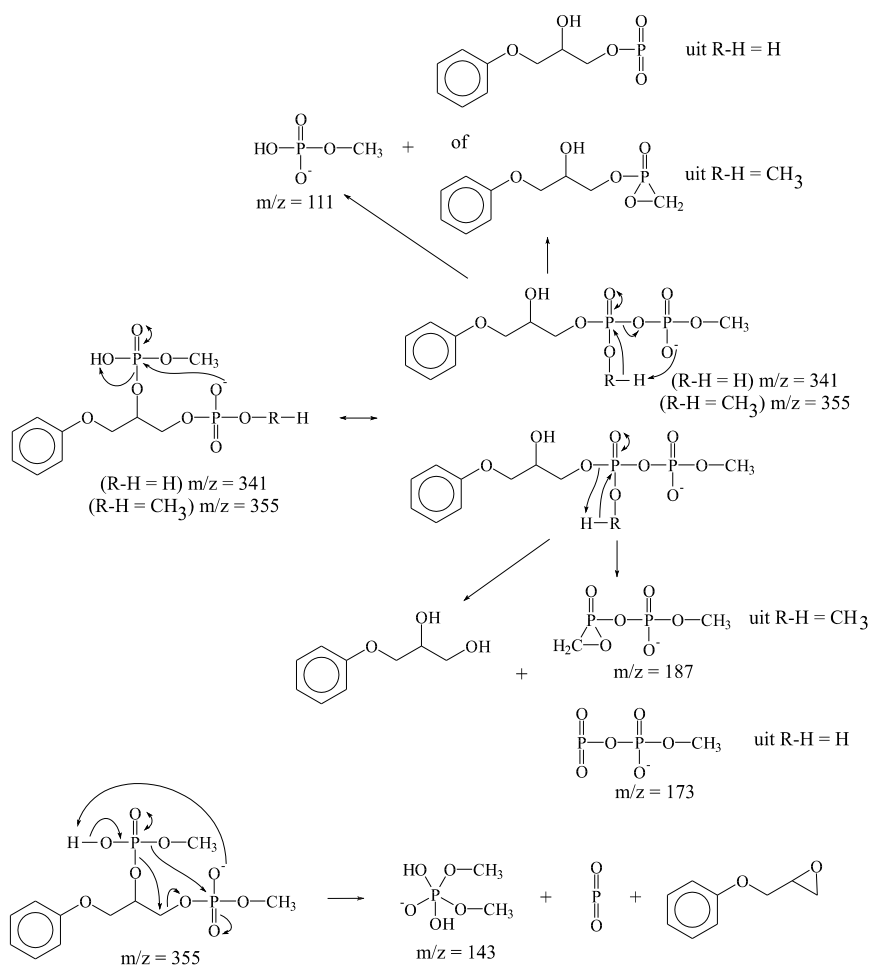
Het fragmentation met m/z 303 ontstaat uit $(M-H)^-$ door verlies van één fenolgroep. Het fenolaat-ion (m/z 93) bewijst de aanwezigheid van ten minste één PGE-groep. De aanwezigheid van het ion met m/z 79 bewijst de aanwezigheid van een fosfaatgroep en de afwezigheid van een fragment met m/z 97 geeft aan dat deze gealkyleerd is. Door de aanwezigheid van deze ionen en het ion met m/z 229 (een PGE-gealkyleerde fosfietgroep ontstaan uit $(M-H)^-$ door verlies van PGE-diol) kan besloten worden dat deze component het gedialkyleerde fosfaat is. Ook dit product wordt gevormd door alkylering van de fosfaatgroep in de DNA-streng resulterend in de vorming van een fosfotriëster. Gezien deze fosfotriëster in de β -positie van de PGE-alkylatie een hydroxylgroep draagt zal deze door interne nucleofiele zuurstofsubstitutie uit de DNA-streng hydrolyseren (Conrad et al., 1986). Waarschijnlijk vindt de tweede alkylatie slechts plaats nadat een eerste fosfo-deoxyribose binding is verbroken. Ook de aanwezigheid van dit adduct bewijst de hypothese van de vorming van een instabiele fosfotriëster met daarop volgende hydrolyse, waardoor de DNA-structuur afgebroken wordt.

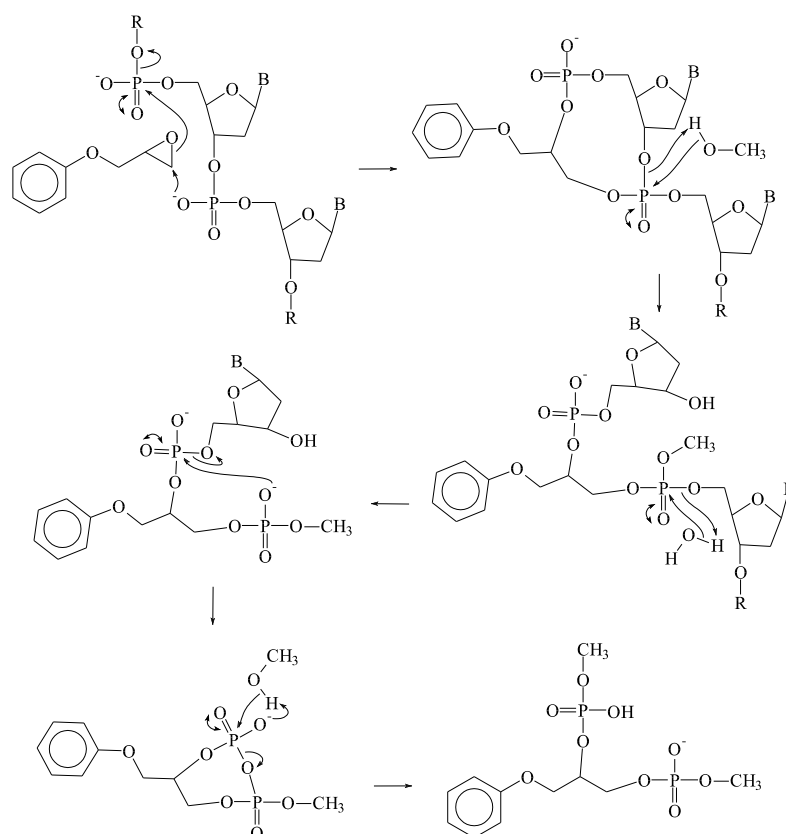
V.4.3.3. Mono-gealkyleerd di-methoxy-difosfaat, $t_m = 18.5$ min.

De structuur van het product met $(M-H)^-$ bij m/z 355 ($t_m = 18.5$ min.) werd bepaald door het opnemen van zijn CZE-ES-MS/MS-productionenspectrum (figuur 5.9). De belangrijkste diagnostische fragmentionen werden gedetecteerd bij m/z : 111, 143, 169 en 187. Een mogelijk fragmentatieschema is weergegeven in figuur 5.10. Het ion bij m/z 111, wat kan toegewezen worden aan een gemethoxyleerde fosfaatgroep, en het ion bij m/z 143, wat kan toegewezen worden aan een di-gemethoxyleerde fosfaatgroep, bewijzen de aanwezigheid van fosfaatgroepen in het product. Samen met het ion bij m/z 187, dat ontstaat door verlies van het PGE-diol uit $(M-H)^-$, en dat kan toegewezen worden aan een di-gemethoxyleerde pyrofosfaatgroep (mits verlies van water), vormen deze productionen voldoende bewijs voor de weergegeven structuur van deze component (figuur 5.6). Aangezien dit adduct twee fosfaatgroepen draagt moeten deze afkomstig zijn uit de DNA-ruggengraat. Deze molecule ontstaat door reactie van PGE met twee fosfaatgroepen gevolgd door een hydrolysereactie. Dit resulteert in

de hydrolyse van de DNA-streng. Een mogelijk reactiemechanisme dat een verklaring geeft voor de aanwezigheid van deze hydrolyseproducten en voor de afbraak van de DNA-streng is weergegeven in figuur 5.11. Gezien de hoge concentratie van dit adduct (figuur 5.5) kunnen we aannemen dat dit één van de belangrijkste reacties is verantwoordelijk voor de DNA-afbraak. Bemerkt dat voor het doorgaan van deze reactie de aanwezigheid van de hydroxylgroep van de PGE-molecule in de β -positie onontbeerlijk is.



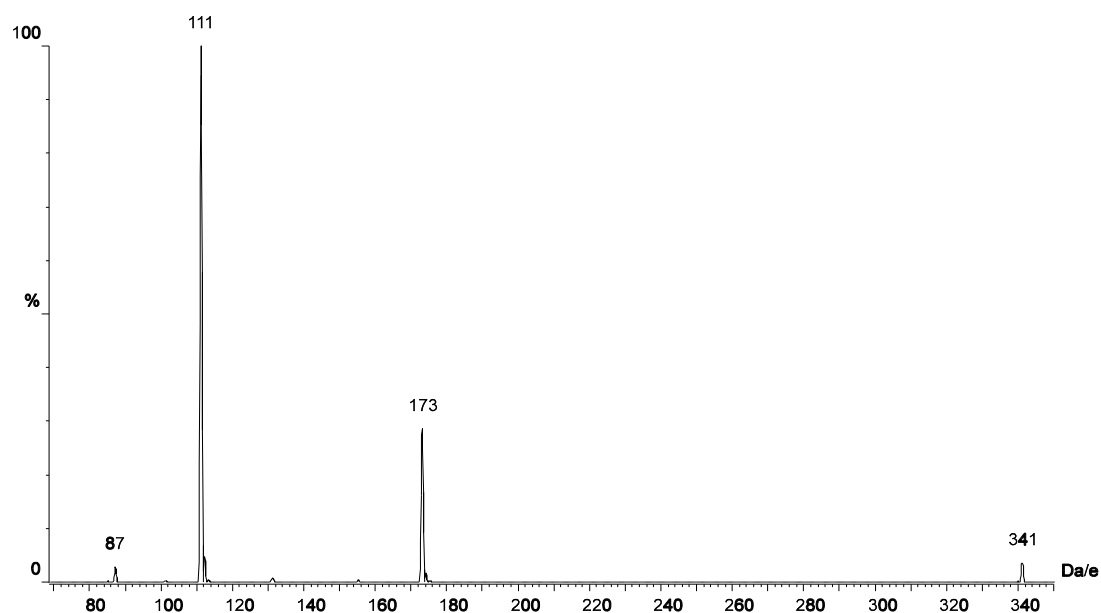




V.4.3.4. Mono-gealkyleerd methoxy-difosfaat, $t_m = 25.0$ min en 25.9 min.

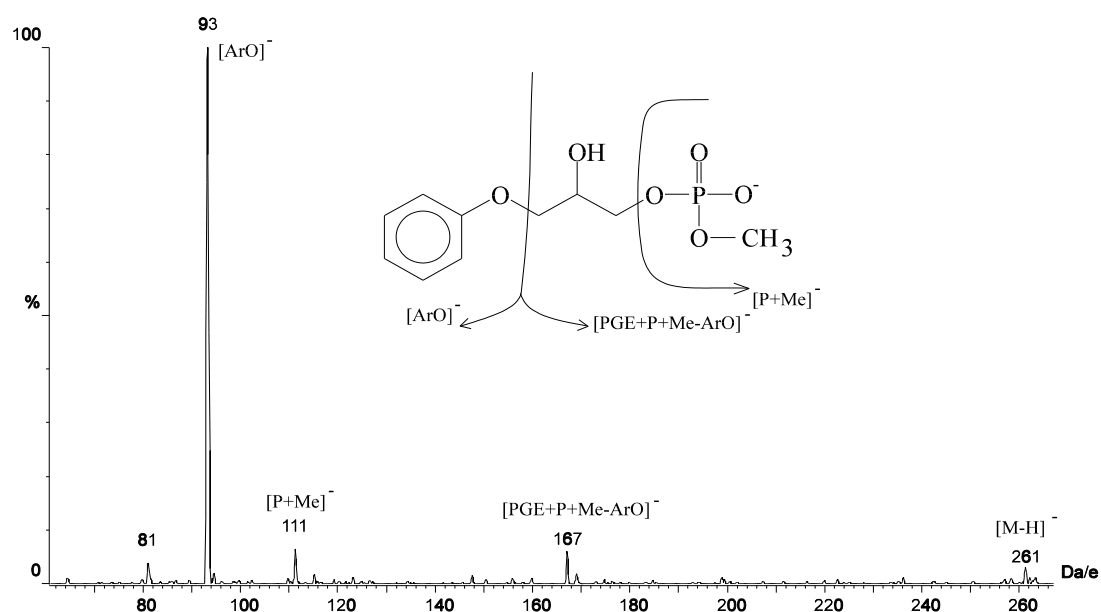
Deze beide verbindingen worden samen besproken daar ze hetzelfde product-ionenspectrum vertonen (figuur 5.12), dit productionenspectrum vertoont de volgende fragmenten die informatie verschaffen over de structuur van $(M-H)^-$ bij m/z 341: m/z 111 en 173. Een mogelijk fragmentatieschema is weergegeven in figuur 5.10. Het ion met m/z 111, zijnde een gemethoxyleerde fosfaatgroep, bewijst de aanwezigheid van een fosfaatgroep in deze structuur. Samen met het ion bij m/z 173 wat kan toegewezen worden aan een gemethoxyleerde pyrofosfaatgroep (mits verlies van water) dat ontstaat door verlies van PGE-diol uit $(M-H)^-$, gaven deze fragmenten voldoende informatie om de structuur van deze component (figuur 5.6) te kunnen achterhalen. Dit product kan eveneens gevormd worden via het reactiemechanisme weergegeven in figuur 5.11. Ook dit adduct is in hoge concentratie aanwezig en het is dan ook aannemelijk dat deze samen met het

PGE-di-methoxy-difosfaat de reactieproducten zijn van de belangrijkste reacties verantwoordelijk voor de degradatie van de DNA-streng.



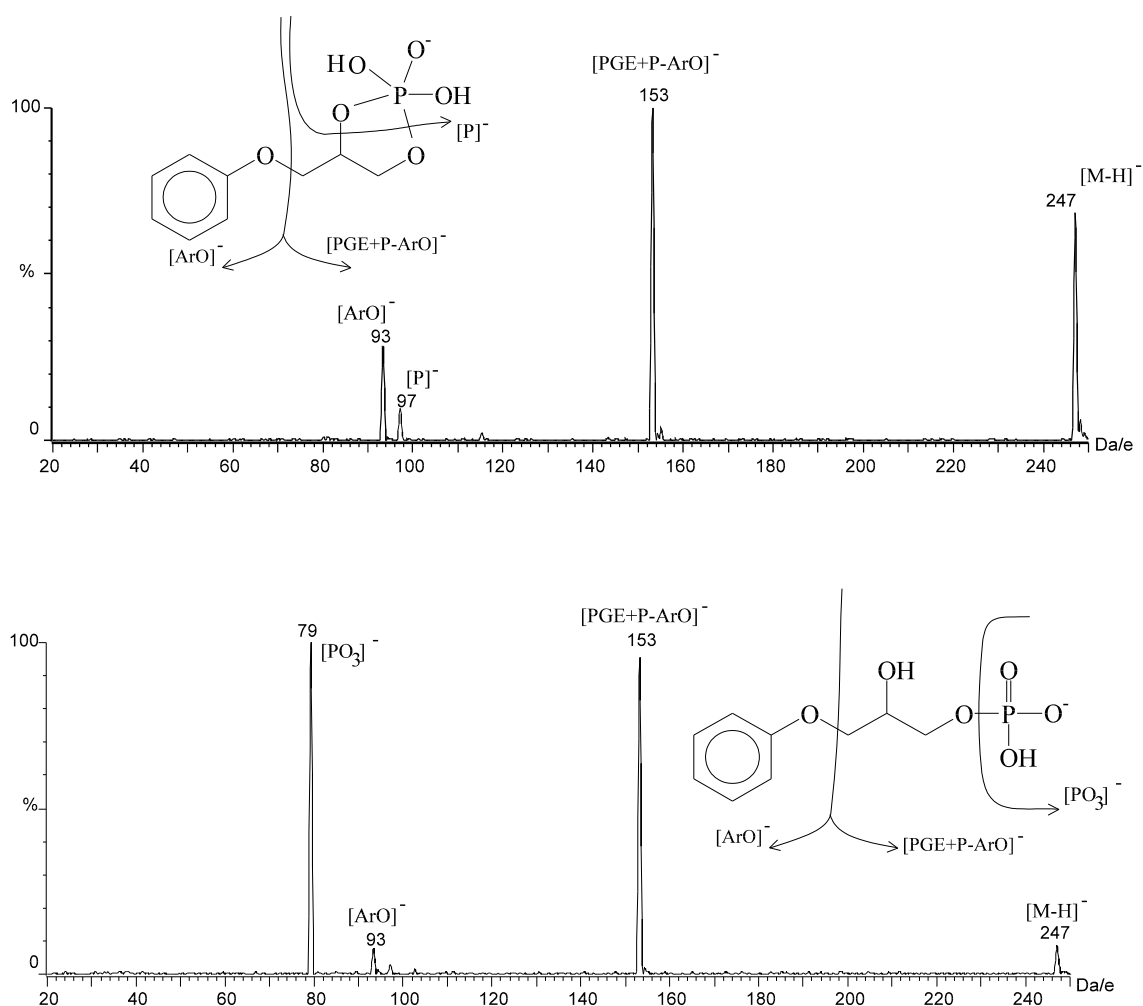
V.4.3.5. Mono-gealkyleerd methoxy-fosfaat, $t_m = 19.5$ min.

Het CZE-ES-MS/MS-spectrum van het adduct met $t_m = 19.5$ min. (figuur 5.13) vertoont de volgende productionen uit $(M-H)^-$ bij m/z 261, die informatie verschaffen over de structuur van deze verbinding: m/z 93, 111 en 167. Een mogelijk fragmentatieschema is weergegeven in figuur 5.13. Het production bij m/z 167 ontstaat uit het moederion door verlies van één fenolgroep. Het fenolaat-ion (m/z 93) bewijst de aanwezigheid van een PGE-groep. Samen met het ion bij m/z 111, wat kan toegewezen worden aan een gemethoxyleerde fosfaatgroep, laten deze fragmenten toe de structuur van deze component op te stellen (figuur 5.6). Ook dit adduct ontstaat door reactie met een fosfaatgroep van de DNA-ruggengraat en daaropvolgende solvolyse. Aangezien de incubatie doorgaat in een solvent dat voor 66% uit methanol bestaat is het niet verwonderlijk dat gedurende deze solvolyse een methanolgroep geïncorporeerd wordt.



V.4.3.6. Mono-gealkyleerd fosfaat, $t_m = 21.5$ min. en 25.4 min.

Deze beide componenten (met $(\text{M-H})^-$ bij m/z 247) worden samen besproken gezien het hier twee structuurisomeren betreft. Beide componenten vertonen echter een verschillend productionenspectrum (figuur 5.14). De mogelijke fragmentatiemechanismen zijn weergegeven in figuur 5.14. Vooral de afwezigheid van het fragment bij m/z 79, zijnde een fosfietgroep, in het bovenste productionenspectrum springt in het oog. De afwezigheid van dit fragment in het desbetreffende spectrum kan verklaard worden door het feit dat het centrale fosforatoom in deze molecule tweemaal gebonden is waardoor bij fragmentatie twee bindingen gebroken zouden moeten worden, wat een minder gunstig proces is.

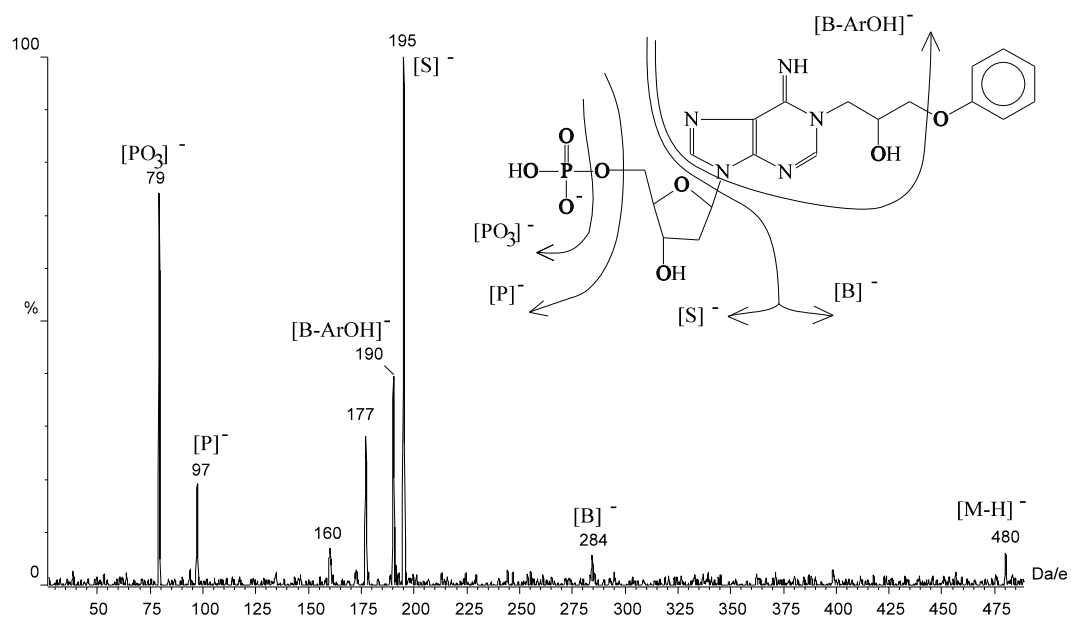


De vooropgestelde structuur van het bovenste isomeer werd ingegeven door de co-migratie met dit product van een component met m/z 229 ($t_m = 21.5$ min., structuur zie figuur 5.6). Verdere fragmenten die structuurinformatie verschaffen voor beide adducten zijn: m/z 93 en 153. Het product bij m/z 153 ontstaat door verlies van een fenolgroep uit $(M-H)^-$, en het fenolaat-ion (m/z 93) bewijst de aanwezigheid van een PGE-groep. Dit vormt voldoende bewijs om aan te nemen dat beide adducten PGE-adducten zijn van een fosfaatgroep. Deze beide adducten ontstaan eveneens door reactie van het PGE-epoxide met een fosfaatgroep van de DNA-streng met daaropvolgende hydrolyse. De aanwezigheid van een verbinding met m/z 229, ontstaan door interne nucleofiele zuurstofsubstitutie op de fosfaatgroep van de β -hydroxylgroep, vormt een bewijs voor het effectief doorgaan

van deze reactie. Het is dan ook duidelijk dat deze reactie medeverantwoordelijk is voor de hydrolyse van de DNA-streng. Ook hier is dus de aanwezigheid van de hydroxylgroep in de β -positie van de PGE-molecule onontbeerlijk.

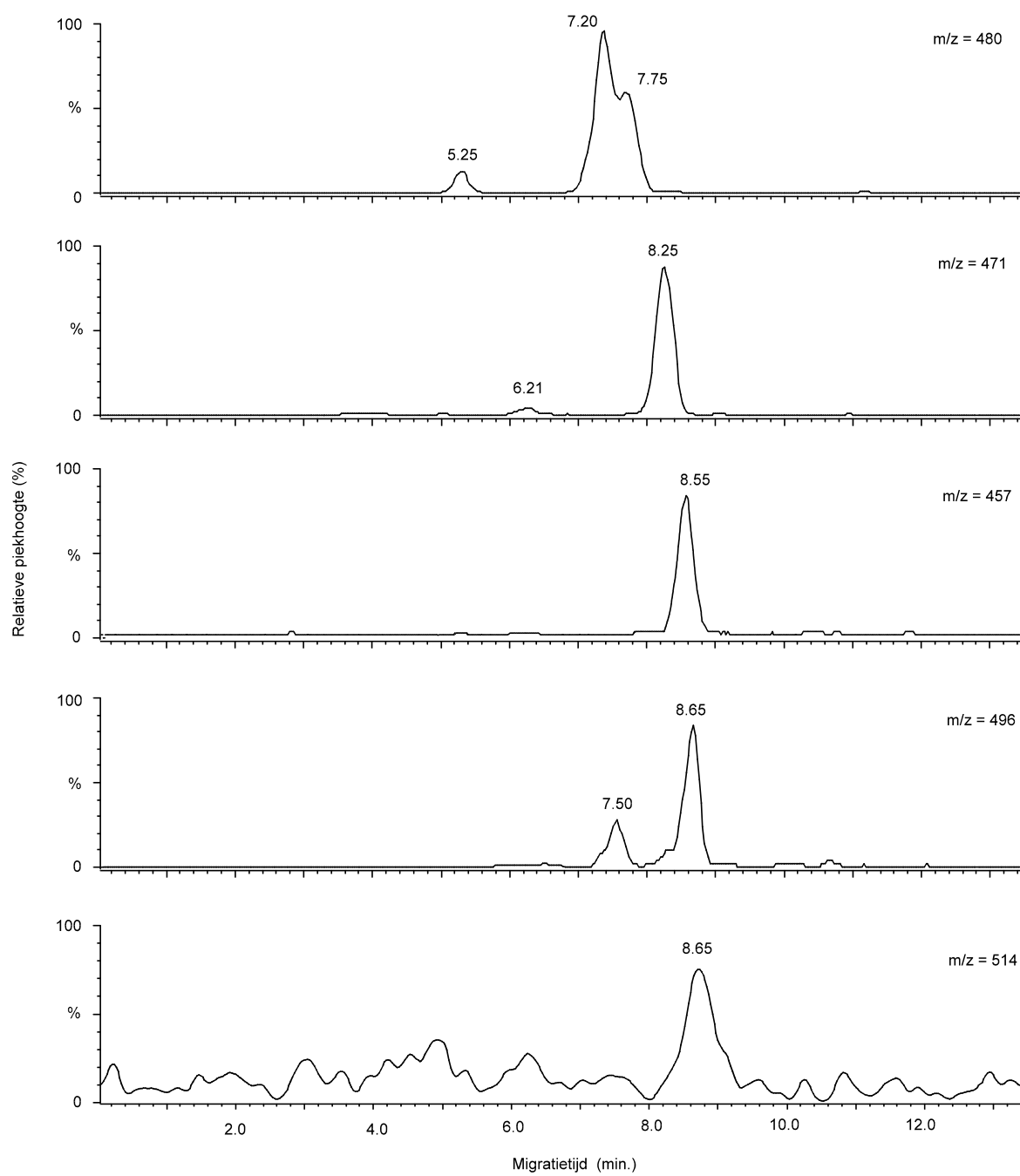
V.4.3.7. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 19.8$ min.

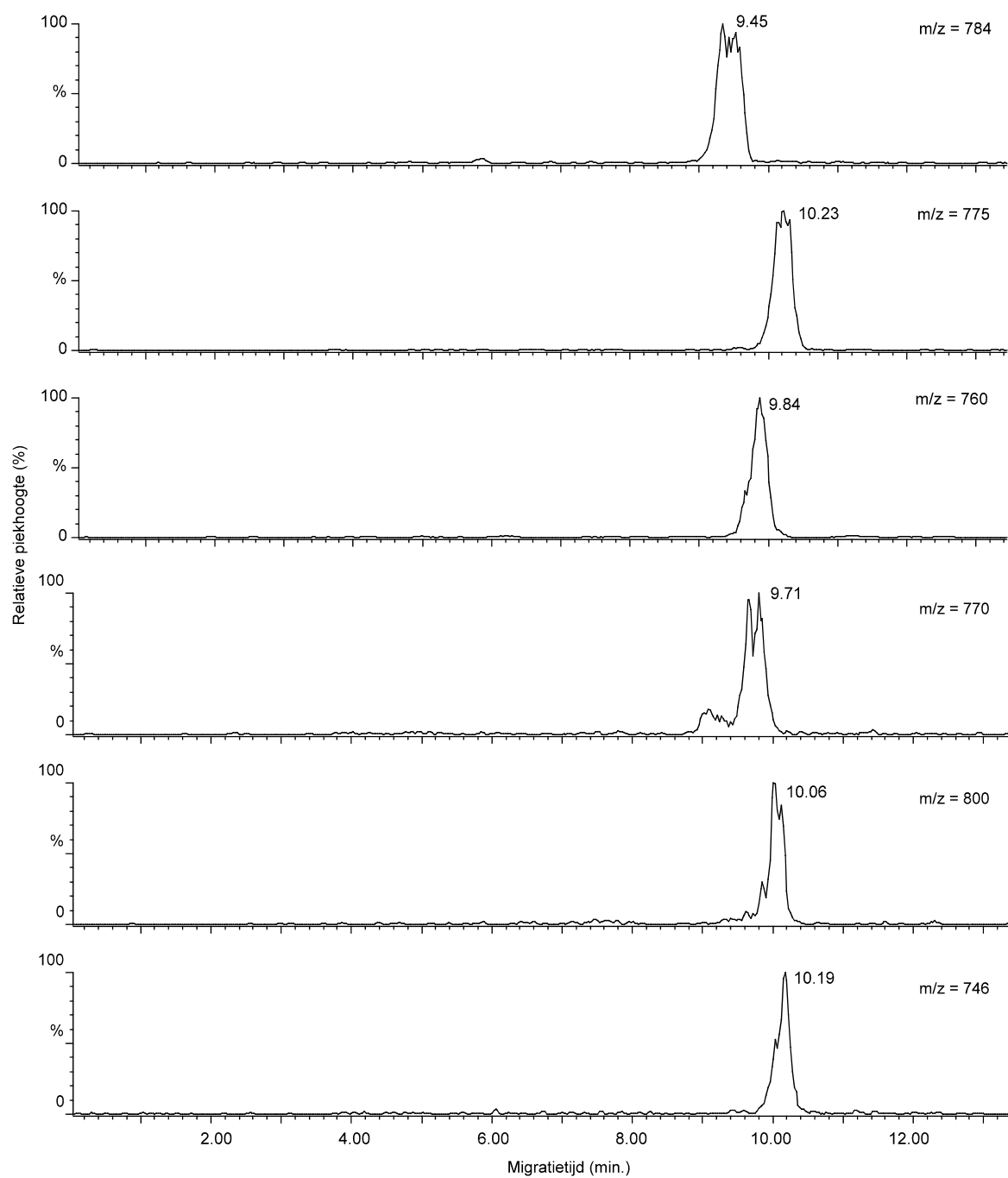
De structuur van dit product werd bepaald door het opnemen van het CZE-ES-MS/MS-spectrum (figuur 5.15) van $(M-H)^+$ bij m/z 480 en met $t_m = 19.8$ min. De belangrijkste diagnostische fragmenten hebben m/z waarden bij: 79, 97, 160, 190, 195 en 284. Dit productionenspectrum is identiek aan het spectrum bekomen voor het base N-1 PGE gealkyleerde dAMP. Een mogelijke fragmentatiereactie voor dit adduct is weergegeven in figuur 4.7 (Hoofdstuk IV) in het gedeelte van de baseadducten en in figuur 4.5 (voor het fragment met m/z 160, Hoofdstuk IV). Het meest intense ion (m/z 195) is afkomstig van de suikerfosfaatgroep en ontstaat door splitsing van de glycosidische binding, waarbij eveneens het ion met m/z 284 gevormd wordt wat toe te wijzen is aan de gealkyleerde base. We kunnen dus stellen dat deze component het N-1 base gealkyleerde PGE-adduct is van dAMP. In het licht van de observatie van de vorige adducten die alle fosfaataalkylaties waren is dit enigszins verwonderlijk. Wel dient opgemerkt te worden dat dit product slechts aanwezig was in het supernatans na een incubatie van 48 uur. Dit suggereert dat deze component geen belangrijke oorzaak is van de DNA-afbraak, daar hij slechts gevormd wordt nadat de DNA-degradatie reeds grotendeels is voltrokken. Het is dus mogelijk dat dit adduct vrijkomt door hydrolyse van de 3'-fosfaatgroep door reactie met PGE.



V.4.4. Adducten aanwezig in het DNA-hydrolysaat

Teneinde de adducten aanwezig in het DNA-hydrolysaat te identificeren werd het CZE-ES-MS (condities zie Hoofdstuk V.3.5) massa-elektroferogram opgenomen (figuren 5.16 en 5.17) van het DNA-hydrolysaat bekomen na nuclease P₁ digestie van het reactiemengsel dat 48 uur geïncubeerd werd met PGE (zie Hoofdstuk V.3.2). Teneinde de ongemodificeerde 5'-monofosfaatnucleotiden te verwijderen werden de stalen onderworpen aan een vaste fase extractie op polystyreen-divinylbenzeen-kolommen. Daarbij werden eveneens de elektrolyten, afkomstig van de digestiebuffer, verwijderd wat aanleiding geeft tot een efficiëntere “sample stacking”, zonder het capillair te overladen (zie Hoofdstuk II). Op basis van hun m/z waarde en hun migratiegedrag werden deze producten tentatief geïdentificeerd (zie tabel 5.2).





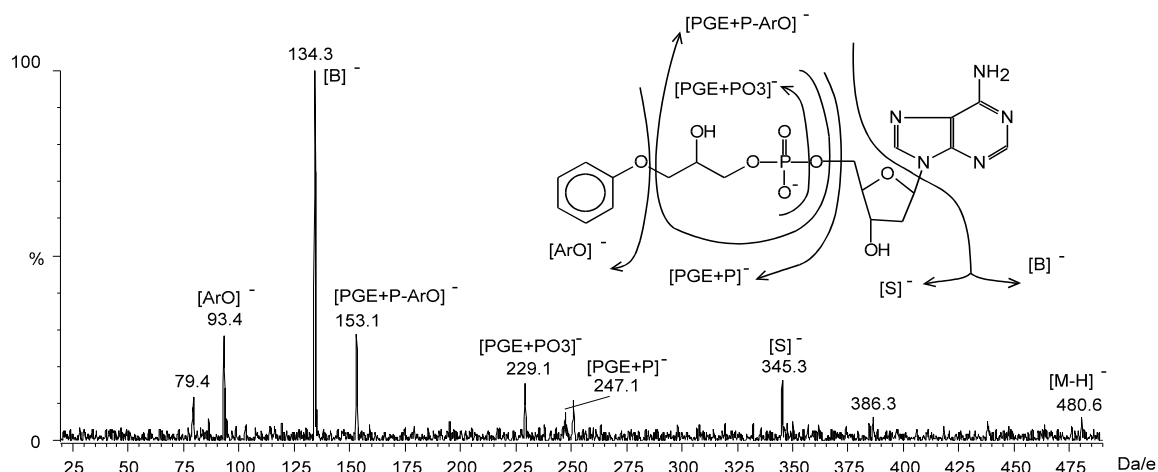
TABEL 5.2: Tentatieve karakterisering van de producten aanwezig in het enzymatische DNA-hydrolysaat van de DNA-pellet na 48 uur incubatie met PGE (zie Hoofdstuk V.3.2).

m/z waarde (M-H) ⁻	t_m (min)	tentatieve karakterisering
480	525	mono-adduct van dAMP met PGE
471	621	mono-adduct van TMP met PGE
480	720	mono-adduct van dAMP met PGE
496	750	mono-adduct van dGMP met PGE
480	775	mono-adduct van dAMP met PGE
471	825	mono-adduct van TMP met PGE
457	855	mono-adduct van dUMP met PGE
496	865	mono-adduct van dGMP met PGE
514	865	imidazoolring-geopend dGMP-PGE adduct
784	945	mono-adduct van dAMP-TMP met PGE
770	971	mono-adduct van dAMP-dUMP met PGE
760	984	mono-adduct van dCMP-TMP met PGE
800	1006	mono-adduct van dGMP-TMP met PGE
746	1019	mono-adduct van dCMP-dUMP met PGE
775	1023	mono-adduct van TMP-TMP met PGE

Van de componenten gekarakteriseerd door m/z 514, 770, 746 en 800 kon, gezien hun lage concentratie, geen productionenspectra opgenomen worden. Om meer structurele informatie te bekomen werden, door middel van CZE-ES-MS/MS, laag energetische CID-spectra opgenomen van de overige componenten. De resultaten van dit onderzoek zijn hierna beschreven.

V.4.4.1. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 5.25$

De structuur van het product met $(M-H)^-$ bij m/z 480 ($t_m = 5.25$ min.) werd bepaald door het opnemen van zijn CZE-ES-MS/MS productionenspectrum (figuur 5.18). De belangrijkste diagnostische fragmenten hebben m/z waarden bij: 134, 229 en 345.



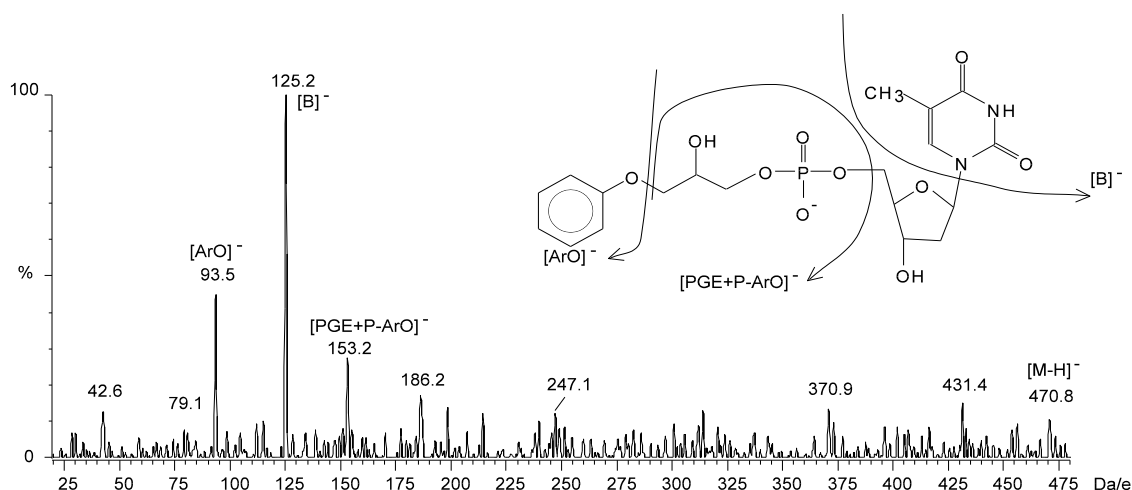
Het bekomen spectrum was identiek aan het productionenspectrum van het fosfaat-gealkyleerde dAMP-adduct bekomen na reactie van PGE met het pure dAMP (zie Hoofdstuk IV.4.1.3). Het fragmentatieschema voor dit adduct is weergegeven in figuur 4.7 (Hoofdstuk IV) in het gedeelte “fosfaatadducten”. Ten gevolge van de 1,2-eliminatie (McLuckey en Habibi-Goudarzi, 1993) van de glycosidische binding ontstaan de ionen bij m/z 345, geïdentificeerd als de gealkyleerde suikerfosfaatgroep, en het ion bij m/z 134, toe te wijzen aan de ongemodificeerde adeninebase. We kunnen dus besluiten dat dit product het fosfaatgealkyleerde PGE-adduct van dAMP is.

Alhoewel dit adduct ten opzichte van de andere adducten in een relatief lage hoeveelheid voorkwam kan dit adduct van groot belang zijn om de cytotoxiciteit of carcinogeniteit van PGE te verklaren. Inderdaad, uit het vorige Hoofdstuk V.4.3 blijkt dat alkylatie van de fosfaatgroep met vorming van een fosfotriëster aanleiding geeft tot hydrolyse van de DNA-streng. Skibo en Schulz (1993) toonden aan dat DNA-breken veroorzaakt ten gevolge van de hydrolyse van

gealkyleerde fosfaatgroepen in pyrrolo[1,2-a]benzimidazole aziridiny quinone-adducten, verantwoordelijk waren voor de cytotoxische activiteit van deze componenten. Eenzelfde redenering kan gevolgd worden voor PGE-alkylering.

V.4.4.2. Mono-adduct van TMP met PGE, $t_m = 6.21$

De structuur van dit adduct werd bepaald door het opnemen van het CZE-ES-MS/MS-spectrum (figuur 5.19) van het product met $(M-H)^-$ bij m/z 471 en met $t_m = 6.21$ min. De belangrijkste diagnostische fragmenten hebben m/z waarden bij 93 en 125.

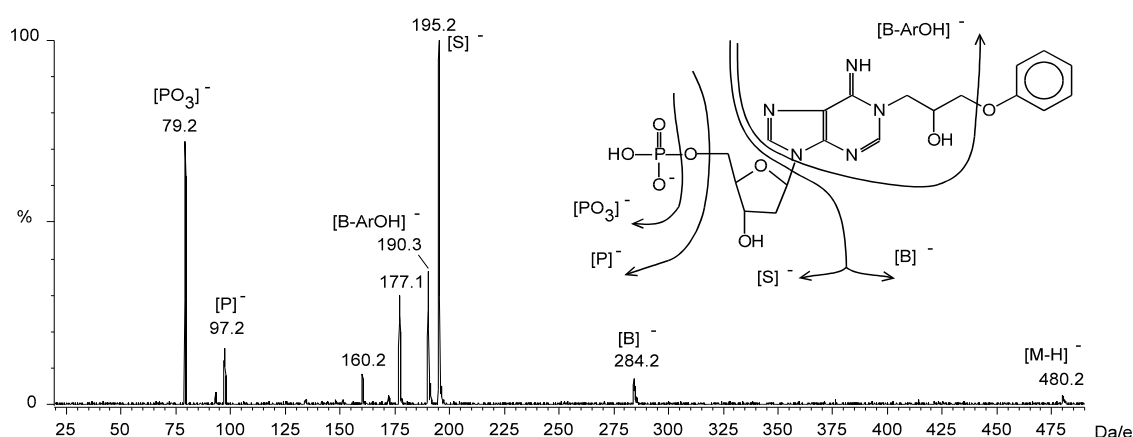


Dit productionenspectrum vertoont overeenkomsten met het spectrum bekomen voor het fosfaat-gealkyleerde TMP-adduct na reactie van PGE met zuiver TMP (zie Hoofdstuk IV.4.4.2). Het ion bij m/z 125, dat kan toegewezen worden aan de ongemodificeerde thyminebase, ontstaat door 1,2-eliminatie van de glycosidische binding. Dit bewijst dat de thyminebase ongemodificeerd is en laat toe de alkylatie op de fosfaatgroep te lokaliseren. Ook dit product komt in een relatief lage concentratie voor in het DNA-hydrolysaat, wat echter niet impliceert dat het van ondergeschikt belang is in de werking van PGE.

V.4.4.3. Mono-adduct van dAMP met PGE, $t_m = 7.20$ min. en 7.75 min.

Deze twee adducten worden samen besproken daar ze hetzelfde

productionenspectrum vertonen (figuur 5.20). Het spectrum uit $(M-H)^-$ bij m/z 480 vertoonde de volgende productionen: m/z 79, 97, 160, 190, 195 en 284. Dit productionenspectrum is identiek aan het laag energetische CID-spectrum bekomen voor het base N-1 gealkyleerde PGE-dAMP-adduct (zie Hoofdstuk IV.4.1.4). Een mogelijk fragmentatieschema voor deze adducten is weergegeven in figuur 4.7 (Hoofdstuk IV) in het gedeelte dat de baseadducten bespreekt en in figuur 4.5 (voor het fragment bij m/z 160, Hoofdstuk IV). Het meest intense fragmention (m/z 195) is afkomstig van de suikerfosfaatgroep en ontstaat door splitsing van de glycosidische binding, waarbij eveneens het ion bij m/z 284 gevormd wordt. Deze laatste m/z -waarde kan toegewezen worden aan de gealkyleerde base. We kunnen dus besluiten dat beide adducten gealkyleerd zijn op de adeninebase. De twee mogelijke alkylerings plaatsen zijn de N-1 en de N⁶ positie (Van den Eeckhout, 1991; Lemière et al., 1996).



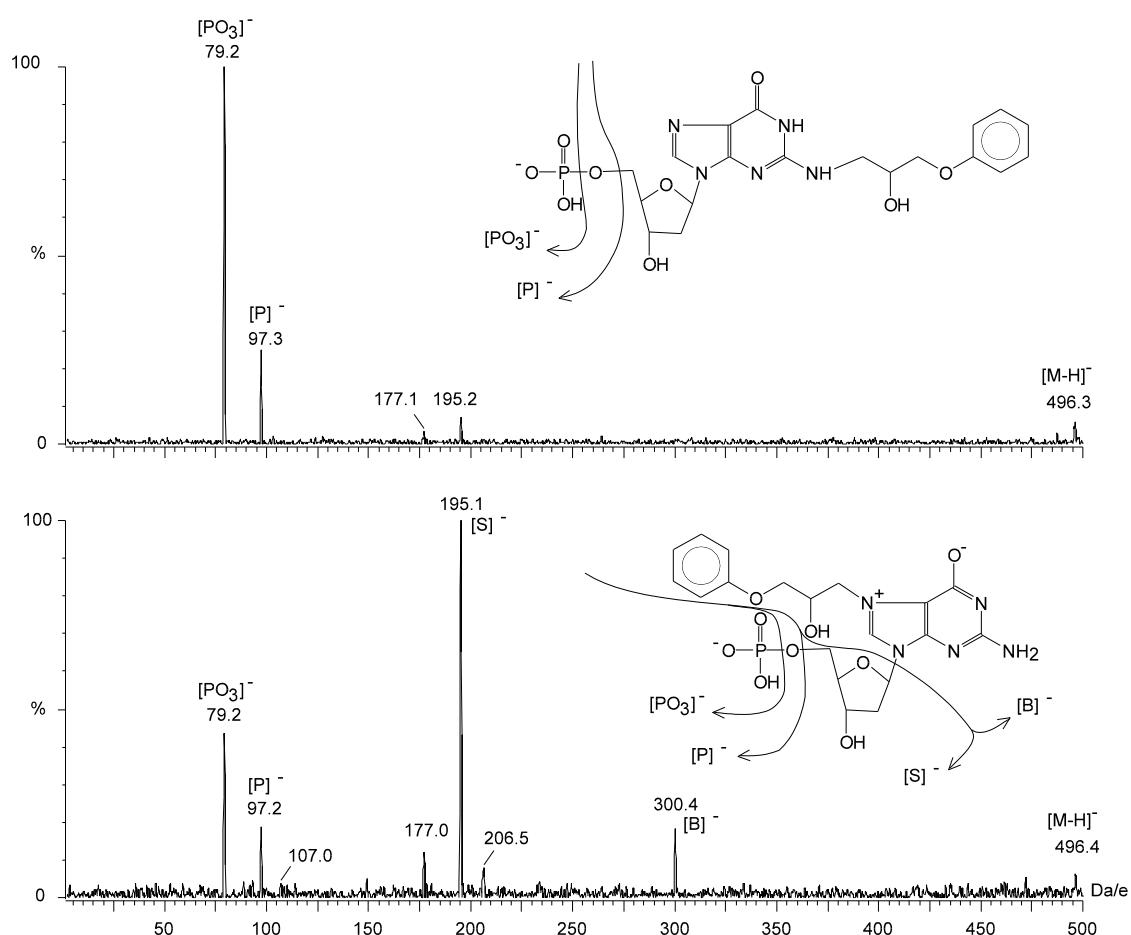
Gezien beide adducten hetzelfde productionenspectrum vertoonden, naast een vergelijkbaar migratiegedrag kon op basis van de hier uitgevoerde experimenten niet aangetoond worden welk adduct op de N-1 of op de N⁶ plaats gealkyleerd is. Differentiatie tussen deze adducten was enkel mogelijk door het uitvoeren van elektro spray in de positieve mode (Lemière et al., 1993; Vanhoutte et al., 1995). Waarschijnlijk wordt ook in het DNA oorspronkelijk de N-1 alkylering gevormd, gezien dit voor het nucleoside de oorspronkelijke reactieplaats is (Van den Eeckhout, 1991; Lemière et al., 1996), en ontstaat hieruit gedurende de incubatie voor de enzymatische hydrolyse van het DNA de N⁶ alkylering. Lemière et al. (1996) toonden aan dat de N⁶ alkylatie door een Dimroth-reactie gevormd wordt uit het N-1 gealkyleerde adduct en dat deze reactie een halfwaardetijd van 20.78 uur vertoont bij 37°C. Gezien de enzymatische DNA-hydrolyse bij 37 °C uitgevoerd wordt, met een duur van 18 uur, is het aannemelijk dat de N⁶ alkylatie tijdens de enzymatische DNA-hydrolyse wordt gevormd.

V.4.4.4. Mono-adduct van dGMP met PGE, $t_m = 7.50$ min en 8.65 min.

Deze beide adducten (met (M-H)⁻ bij m/z 496) worden samen besproken gezien het hier twee plaatsisomeren betreft. Beide componenten vertonen een verschillend productionenspectrum (figuur 5.21). De belangrijkste diagnostische fragmenten in het bovenste spectrum zijn: m/z 79 en 97. Waaruit weinig structurele informatie kan bekomen worden. De CID-geïnduceerde fragmentatie kon niet verbeterd worden door de botsingsenergie te variëren (een gebied van 20 - 30 eV werd getest). Het fragmentatieschema is bovenaan in figuur 5.21 gegeven. De enige beduidende fragmenten zijn afkomstig van de afsplitsing van de fosfaatgroep. Hieruit kunnen we dan ook alleen besluiten dat de alkylgroep gelokaliseerd is op het purine gedeelte.

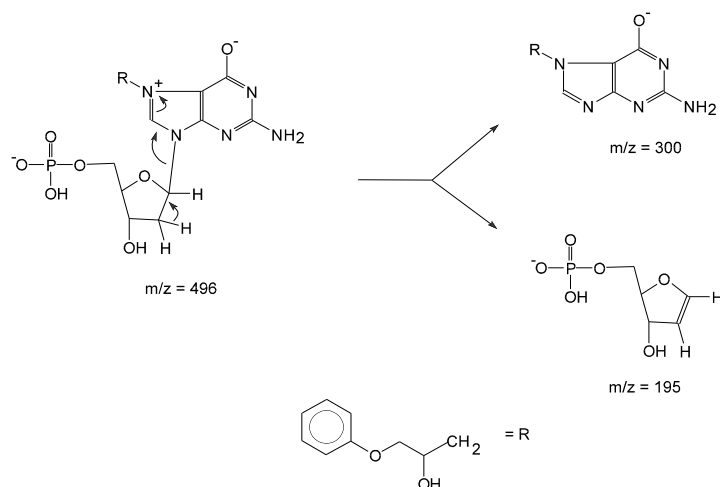
Het onderste spectrum, dat meer structurele informatie verschaft, vertoont de volgende fragmenten: m/z 79, 97, 195, 206 en 300. Dit spectrum vertoont veel gelijkenis met het productionenspectrum bekomen voor het N-7 base gealkyleerde dGMP. Een mogelijk fragmentatieschema is weergegeven in figuur 4.7 (Hoofdstuk IV) in het gedeelte handelend over de baseadducten. Het meest intense

ion in dit spectrum (m/z 195) kan toegewezen worden aan de suikerfosfaatgroep en ontstaat door 1,2-eliminatie van de glycosidische binding, daarbij wordt eveneens het ion bij m/z 300 gevormd, wat overeenstemt met de gealkyleerde base. Het verschil in fragmentatie tussen beide spectra kan verklaard worden wanneer aangenomen wordt dat het onderste spectrum afkomstig is van het N-7 gealkyleerde adduct. In het N-7 gealkyleerde adduct is de glycosidische binding verzwakt door de nabijheid van het quaternair N-7 (figuur 5.22), en zal sneller breken met vorming van de ionen bij m/z 300 en 195.



Samen met dit product migreert ook het imidazoolring-geopende adduct (figuur 5.16, m/z 514). Dit ontstaat door imidazoolring-opening van het N-7 gealkyleerde adduct. Samen met de gegevens bekomen na CZE-ES-MS/MS kunnen we hieruit besluiten

dat het product met $t_m = 8.65$ min. het N-7 gealkyleerde PGE-adduct van dGMP is.



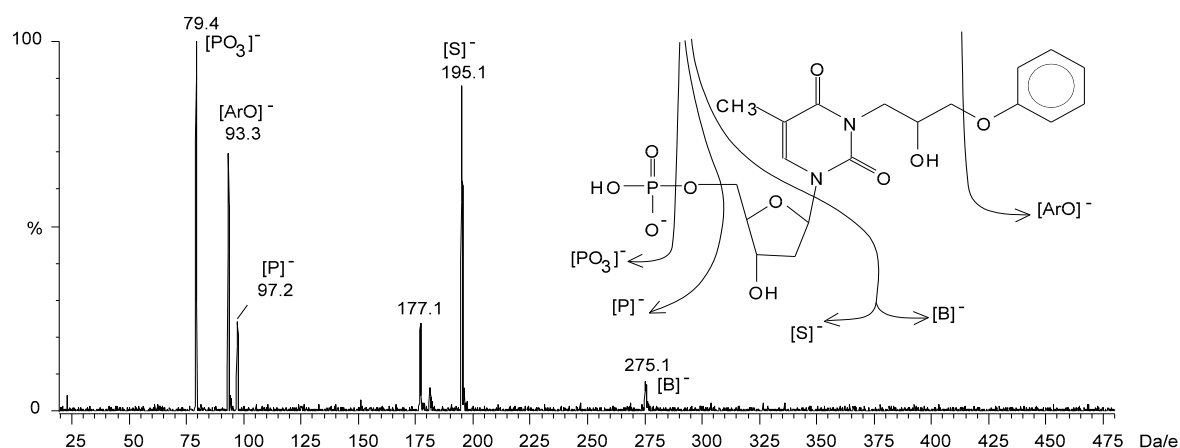
Het adduct met $t_m = 7.50$ min. vertoont zo goed als geen productionen bij m/z 195 en m/z 300. Dit kan mogelijk verklaard worden door de afwezigheid van N-7 alkylatie. Hierdoor is er geen quaternair N-7 atoom aanwezig wat resulteert in een sterkere glycosidische binding. Dit adduct vertoont ook geen co-migratie met een ring-geopend adduct wat eveneens suggereert dat we hier niet met een N-7 alkylatie te maken hebben. Gezien Van den Eeckhout (1991) met behulp van NMR- en UV-spectrometrie aangetoond heeft dat op het nucleoside vlak een tweede, minder reactieve, alkylerings plaats het N² atoom is, kunnen we aannemen dat dit adduct het N² gealkyleerde PGE-adduct van dGMP is, alhoewel er massaspectrometrisch geen sluitend sluitend bewijs is.

Alhoewel dit N²-gealkyleerde adduct niet teruggevonden werd in het reactiemengsel van dGMP met PGE, zijn beide adducten in het DNA-hydrolysaat met een vergelijkbare intensiteit aanwezig (figuur 5.16). Dit verschil kan toegewezen worden aan de verschillen in de beschikbaarheid van de beide alkyleringsplaatsen in DNA in vergelijking met dGMP in vrije oplossing.

V.4.4.5. Mono-adduct van TMP met PGE, $t_m = 8.25$ min.

De structuur van het product met $(M-H)^-$ bij m/z 471 ($t_m = 8.25$ min.) werd bepaald door het opnemen van zijn CZE-ES-MS/MS productionenspectrum

(figuur 5.23). De belangrijkste diagnostische fragmenten hebben m/z waarden bij: 79, 97, 195 en 275.



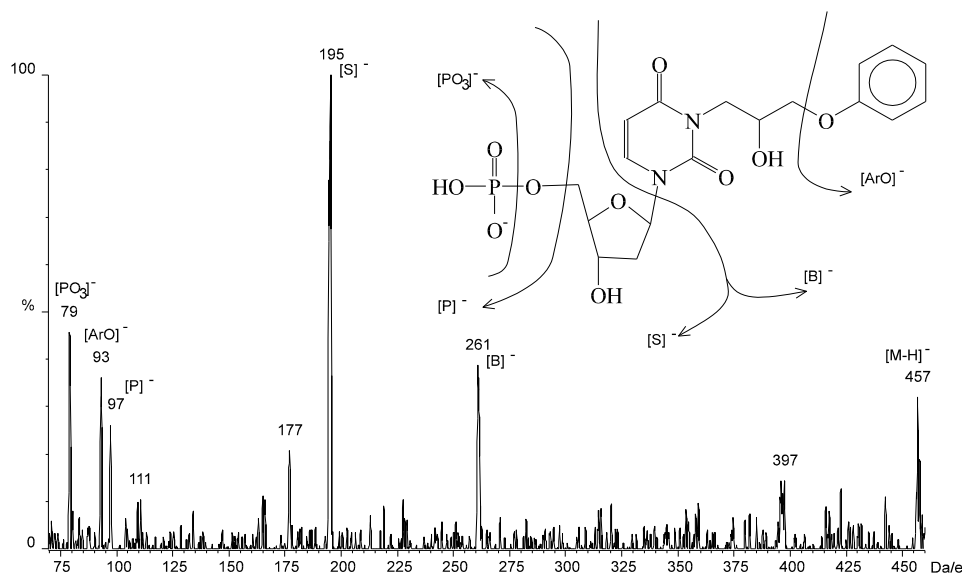
Het fragmentatieschema voor dit adduct is gegeven in figuur 4.7 (Hoofdstuk IV) meer bepaald in het gedeelte dat de baseadducten bespreekt. Het fragmentation bij m/z 195 kan toegewezen worden aan de suikerfosfaatgroep en ontstaat door 1,2-eliminatie van de glycosidische binding. Hierbij wordt eveneens het ion bij m/z 275 gevormd. Dit stemt overeen met de gealkyleerde thyminebase. Voornoemde ionen verklaren dan ook, op een ondubbelzinnige wijze, een alkylation op de pyrimidinebase van het TMP. Alhoewel dit adduct in een relatief hoge concentratie voorkomt in het DNA-hydrolysaat werd in het reactiemengsel van TMP met PGE geen basegealkyleerd TMP teruggevonden. Dit verschil in reactiviteit kan eventueel verklaard worden door de verschillen in de beschikbaarheid van de base in het DNA in vergelijking tot TMP in vrije oplossing.

Alhoewel uit dit productionenspectrum geen informatie bekomen werd over de alkyleringsplaats op de thyminebase, is het aannemelijk dat de alkyleringsplaats hier het N-3 atoom is. Het N-3 atoom werd door Van den Eeckhout (1991) aangewezen als de alkyleringsplaats op het thymidine nucleoside, op basis van NMR-, UV- en FAB-MS-gegevens.

V.4.4.6. Mono-adduct van dUMP met PGE, $t_m = 8.55$ min.

De structuur van dit adduct werd bepaald door het opnemen van het

CZE-ES-MS/MS-spectrum (figuur 5.24) van het product met $(M-H)^-$ bij m/z 457 en met $t_m = 8.55$ min. De belangrijkste diagnostische fragmentionen werden gedetecteerd bij m/z : 79, 97, 195 en 261.



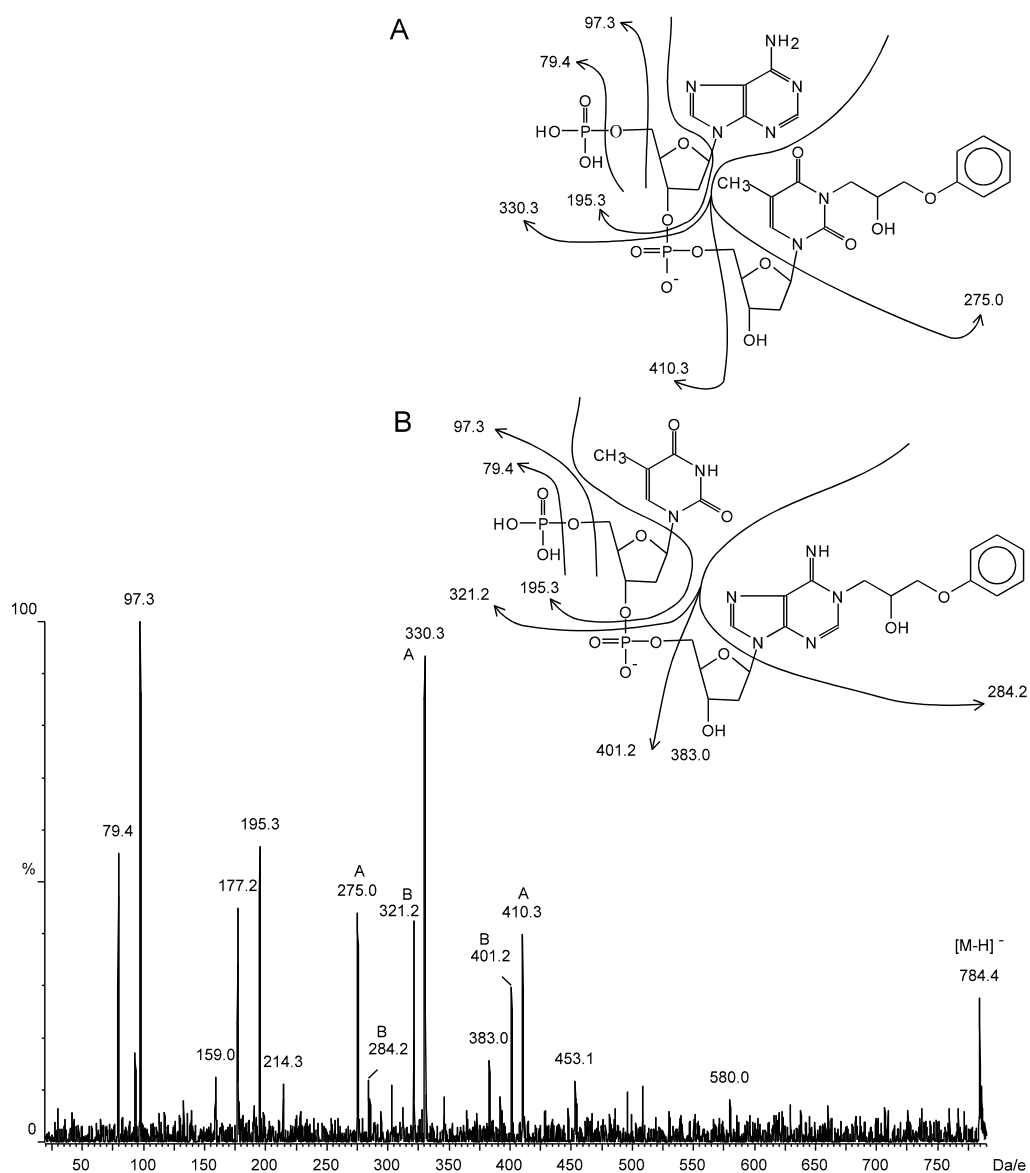
Dit productionenspectrum was identiek aan het spectrum bekomen voor het N-3 gealkyleerde dUMP-adduct. Het fragmentatieschema voor dit product is weergegeven in figuur 4.7 (Hoofdstuk IV) en wel in het gedeelte van de baseadducten. Het ion bij m/z 261 bewijst de aanwezigheid van de PGE-groep op het uracilgedeelte. We kunnen dan ook besluiten dat voornoemde verbinding het N-3 gealkyleerde PGE-adduct van dUMP is. Alhoewel dUMP niet voorkomt in kalfthymus DNA ontstaat het, zoals reeds eerder vermeld, uit het N-3 gealkyleerde PGE-adduct van dCMP door hydrolytische deaminatie.

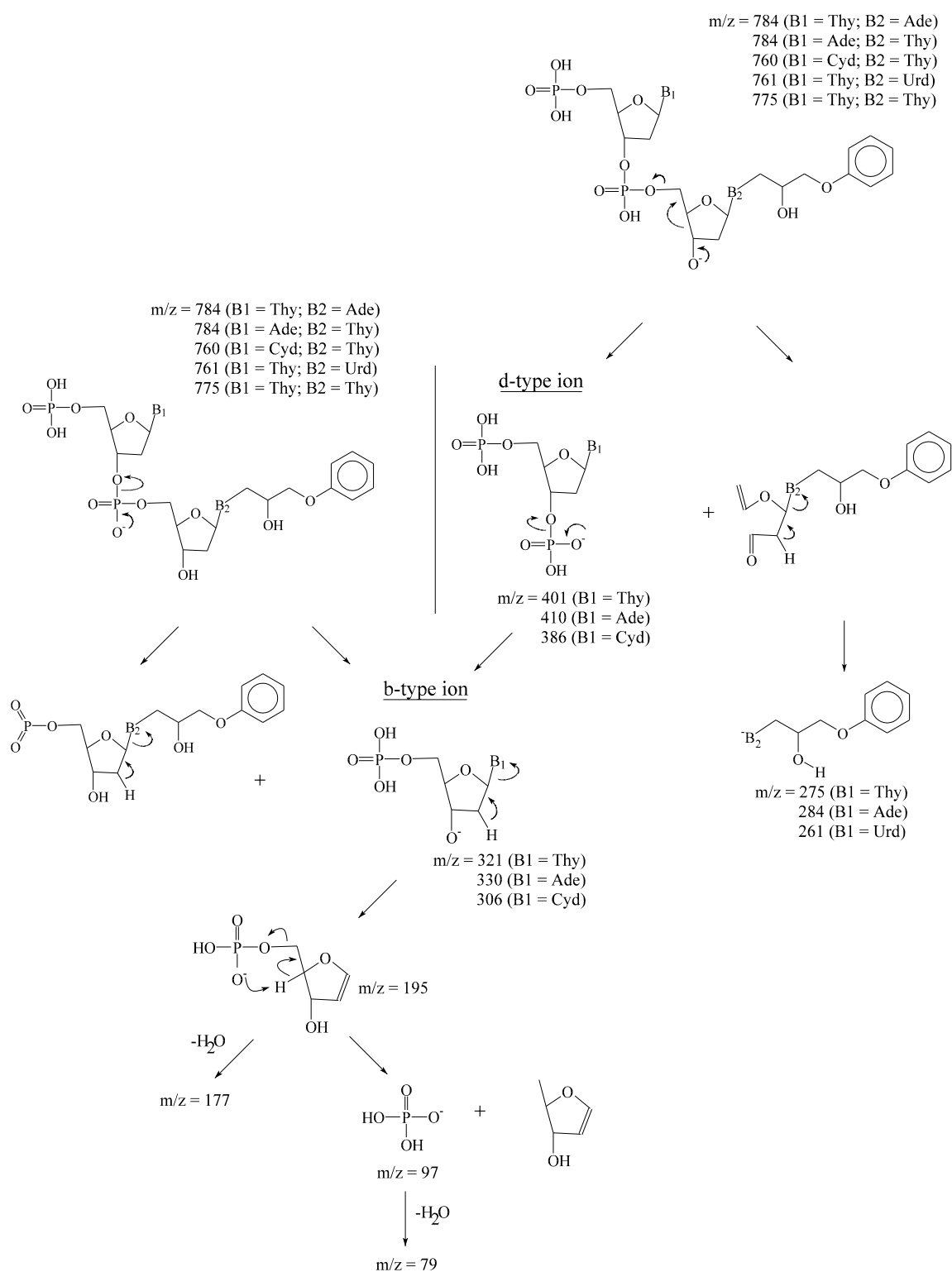
In het DNA-hydrolysaat werden geen dCMP-adducten teruggevonden, wat betekent dat alle initieel gevormde dCMP N-3 adducten gedeamineerd werden. Gezien dit niet het geval was in het reactiemengsel van dCMP met PGE, kan aangenomen worden dat deze deaminatiereactie in grotemate doorgaat tijdens de enzymatische hydrolyse.

V.4.4.7. Mono-adduct van dAMP-TMP met PGE, $t_m = 9.45$ min.

De molecuulmassa van dit adduct, zijnde 785 [(M-H)⁻ bij m/z 784], kan verklaard worden door de aanwezigheid van het pA-PGE-pT, pApT-PGE, pT-PGE-pA en/of pTpA-PGE-mono-gealkyleerde dinucleotide. De aanwezigheid van deze gealkyleerde dinucleotiden in het DNA-hydrolysaat kan verklaard worden door het feit dat, zoals besproken in het literatuuroverzicht, nuclease P₁ aanleiding kan geven tot onvolledige hydrolyse in de aanwezigheid van sterk gemodificeerde basen (Crain, 1990). Teneinde meer structurele informatie te bekomen over deze dinucleotide mono-adducten werd hun CZE-ES-MS/MS productionenspectrum opgenomen (figuur 5.25). De meest informatieve productionen in dit spectrum hebben m/z-waarden bij: 97, 275, 284, 321, 330, 401 en 410. Een mogelijk fragmentatieschema voor deze gealkyleerde dinucleotiden is weergegeven in figuur 5.26. Analyse van het productionenspectrum leert dat twee adducten co-migreren en dat dit spectrum fragmentionen bevat van twee verschillende moleculen.

Het eerste adduct pTpA-PGE, geeft aanleiding tot een specifiek ion bij m/z 321, wat een b-type ion is (figuur 5.26), overeenkomend met het ongemodificeerde TMP. Het ion bij m/z 401, een d-type ion (figuur 5.26), komt overeen met het ongemodificeerde thymidine 5'-3'-difosfaat. De aanwezigheid van deze ionen evenals het ion bij m/z 284, wat kan toegewezen worden aan de gealkyleerde adeninebase, bewijst de aanwezigheid van een TMP-dAMP dinucleotide dat gealkyleerd is op de adeninebase.





Het tweede adduct pApT-PGE, wat aanleiding geeft tot de meest intense fragmentionen vertoont de volgende specifieke ionen: m/z 330, wat het b-type ion is dat overeenstemt met het ongemodificeerde dAMP 5'-mononucleotide

en m/z 410, wat het d-type ion is, toe te wijzen aan het ongemodificeerde deoxyadenosine 5'-3'-difosfaat. Deze ionen samen met het fragment bij m/z 275, dat overeenstemt met de gealkyleerde thyminebase, bewijzen de aanwezigheid van een dAMP-TMP dinucleotide dat gealkyleerd is op de thyminebase.

De afwezigheid van m/z 480 (b-type ion, van gealkyleerd dAMP), m/z 560 (d-type ion, van gealkyleerd deoxyadenosine 5'-3'-difosfaat), m/z 471 (b-type ion, van gealkyleerd TMP) en m/z 551 (d-type ion, van gealkyleerd thymidine 5'-3'-difosfaat) toont aan dat er geen pA-PGE-pT noch pT-PGE-pA aanwezig is.

V.4.4.8. Mono-adduct van dCMP-TMP met PGE, $t_m = 9.84$ min.

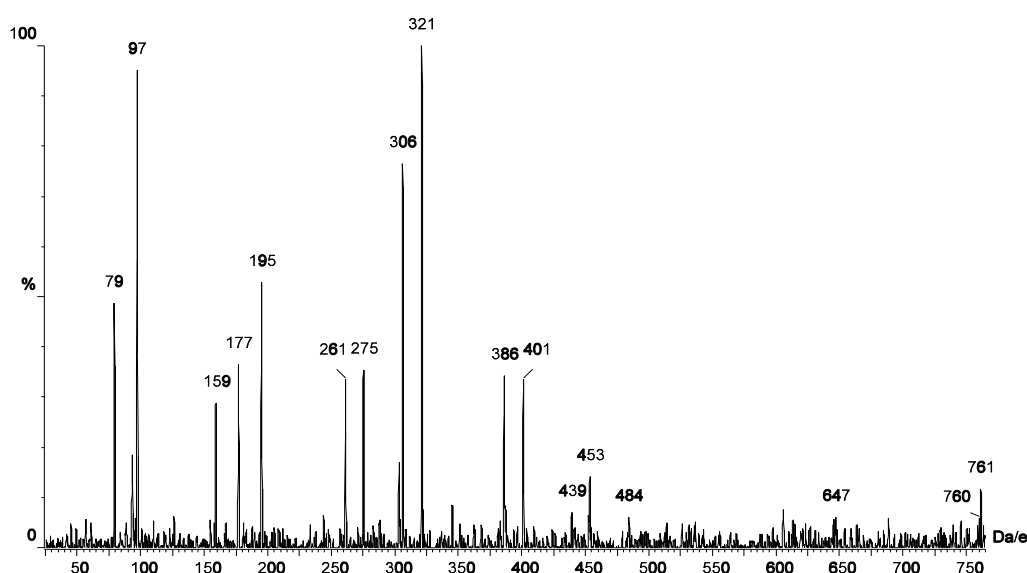
De molecuulmassa van dit adduct, zijnde 761 $[(M-H)^-]$ bij m/z 760], kan verklaard worden door de aanwezigheid van het pCpT-PGE, pC-PGE-pT, pTpC-PGE en/of pT-PGE-pC mono-gealkyleerde dinucleotide. De meest informatieve fragmentionen aanwezig in het CZE-ES-MS/MS productionenspectrum (figuur 5.27) van deze component(en) werden gedetecteerd bij m/z : 97, 261, 275, 306, 321, 386 en 401. Het tentatief fragmentatieschema is weergegeven in figuur 5.26.

Het ion bij m/z 306, een b-type ion (figuur 5.26), kon toegewezen worden aan het ongemodificeerde dCMP 5'-mononucleotide samen met het ion bij m/z 386, een d-type ion, dat overeenstemt met het ongemodificeerde deoxycytosine 5'-3'-difosfaat, en het ion bij m/z 275, dat toegewezen kon worden aan de gealkyleerde thyminebase. Deze ionen bewijzen de aanwezigheid van een dCMP-TMP dinucleotide dat gealkyleerd is op de thyminebase met de sequentie pCpT-PGE.

Het fragmention bij m/z 321, een b-type ion, kon toegewezen worden aan het ongemodificeerde TMP 5'-mononucleotide en het ion bij m/z 401, een d-type ion, dat correspondeert met het ongemodificeerde thymidine 5'-3'-difosfaat, laten toe te besluiten dat het dinucleotide-adduct met de sequentie pTpC-PGE eveneens aanwezig is. Het production bij m/z 260 dat te verwachten is bij dit adduct en dat overeenstemt met de gealkyleerde cytidinebase is echter afwezig. Wel is er een fragmention aanwezig bij m/z 261, dat overeen stemt met het gealkyleerde

uridinebase. Gecombineerd met de observatie van een zwak ion bij m/z 761 kunnen we hieruit besluiten dat dit adduct het pTpU-PGE-dinucleotideadduct is, gealkyleerd op de N-3 positie van de uridinebase. Zoals reeds eerder aangehaald ontstaat dit adduct door hydrolytische deaminatie van de N-3 gealkyleerde cytidinebase. Uit de afwezigheid van het ion bij m/z 260 kunnen we besluiten dat het pTpC-PGE-adduct door deaminatie totaal omgezet werd in het pTpU-PGE-adduct.

De afwezigheid van fragmentionen bij m/z 471 (b-type ion van gealkyleerd TMP), bij m/z 551 (d-type ion van gealkyleerd thymidine 5'-3'-difosfaat), bij m/z 457 (b-type ion, van gealkyleerd dUMP) en bij m/z 537 (d-type ion, van gealkyleerd deoxyuridine 5'-3'-difosfaat) toonde aan dat er geen pT-PGE-pC noch pU-PGE-pT dinucleotiden aanwezig waren.

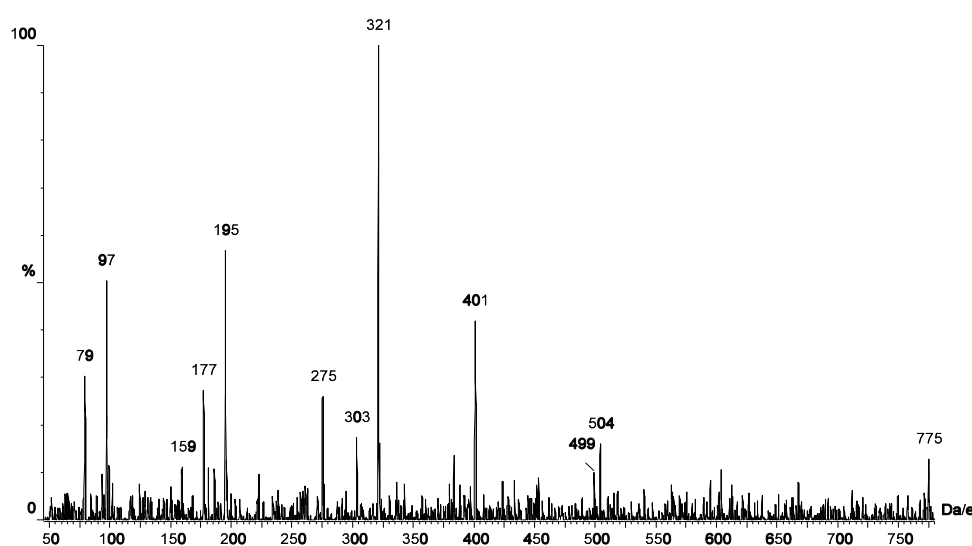


V.4.4.9. Mono-adduct van TMP-TMP met PGE, $t_m = 10.23$ min.

De molecuulmassa 776 [$(M-H)^-$ bij m/z 775] van deze verbinding stemt overeen met het mono-gealkyleerde pT-PGE-pT en/of pTpT-PGE dinucleotide. In het CZE-ES-MS/MS productionenspectrum (figuur 5.28) geven de volgende ionen de meeste informatie: m/z 97, 275, 321 en 401. Het fragmentatieschema is weergegeven in figuur 5.26. Het fragmention bij m/z 321, een b-type ion (figuur 5.26), is toe te wijzen aan het ongemodificeerde TMP 5'-mononucleotide terwijl het ion bij

m/z 401, een d-type ion (figuur 5.26), toe te wijzen is aan het ongemodificeerde thymidine 5'-3'-difosfaat. De aanwezigheid van deze ionen evenals het ion bij m/z 275, dat kan toegewezen worden aan de gealkyleerde thyminebase, bewijst de aanwezigheid van een TMP-TMP dinucleotide dat gealkyleerd is op de thyminebase met de sequentie pTpT-PGE.

De afwezigheid van fragmentionen bij m/z 471 (b-type ion, van gealkyleerd TMP) en bij m/z 551 (d-type ion, van gealkyleerd thymidine 5'-3'-difosfaat) bewijst de afwezigheid van een adduct met de sequentie pT-PGE-pT.



V.4.5. Verder onderzoek van de gealkyleerde dinucleotiden

Om te achterhalen of het nuclease P_1 enzym door bepaalde specifieke adducten werd geïnhibeerd om zodoende dinucleotideadducten te vormen, werden de dinucleotiden onderworpen aan een extra enzymatische hydrolysestap met het SVP-enzym. Het was reeds duidelijk uit de productionenspectra van de dinucleotideadducten dat de alkylation plaatsgreep op het basedeel van het dinucleotide. Omdat echter niet van alle dinucleotideadducten CZE-ES-MS/MS-data

bekomen konden worden, gezien hun te lage concentratie, werden deze aanvullende experimenten uitgevoerd.

Teneinde te achterhalen welke adducten aanwezig waren in de dinucleotiden werden de DNA-reactiemengsels (na 48 uur incubatie) geanalyseerd op CZE-ES-MS na hydrolyse met nuclease P_1 , uitgevoerd zoals beschreven in Hoofdstuk V.3.2, en na bijkomende hydrolyse met SVP, uitgevoerd zoals beschreven in Hoofdstuk V.4.1.2. Teneinde de concentratie van de adducten aanwezig in beide hydrolysaten te kunnen vergelijken werden de oppervlaktes onder de curve van de adducten vergeleken met de oppervlakte onder de curve van het ongemodificeerde dAMP aanwezig in de DNA-hydrolysaten voor en na SVP-hydrolyse (tabel 5.3). Aangezien dAMP nodig was in deze analyses als inwendige standaard om de relatieve OUC's te kunnen vergelijken werden deze stalen uiteraard niet onderworpen aan de vaste fase extractie (Hoofdstuk II.3.7).

Gezien enkel de concentratie van de basegealkyleerde adducten toeneemt na SVP-hydrolyse was het dus de aanwezigheid van de alkylgroep op de base-, en niet fosfaatalkylatie, die verantwoordelijk was voor de onvolledige hydrolyse door het nuclease P_1 enzym. Deze gegevens suggereren dat alle dinucleotiden gemodificeerd zijn op een baseresidu. Dit is in overeenstemming met de resultaten bekomen na CZE-ES-MS/MS-analyse van de dinucleotiden.

Opmerkelijk is ook dat er een sterkere toename is in de pyrimidine gealkyleerde adducten (TMP en dCMP dat door hydrolytische deaminatie omgezet is naar dUMP) dan in de purine gealkyleerde adducten (dAMP en dGMP). Dit laat vermoeden dat alkylering van pyrimidine basen het nuclease P_1 beter inhibeert. Dit wordt ook bevestigd door de CZE-ES-MS/MS-data waar de mono-gealkyleerde pyrimidine dinucleotiden het meest aanwezig zijn (zie Tabel 5.2).

TABEL 5.3: Verhouding van de oppervlaktes onder de curven (OUC's) van de verschillende adducten tot de oppervlakte onder de curve van ongewijzigd dAMP, vóór en na SVP-hydrolyse.

voor SVP hydrolyse	na SVP hydrolyse
--------------------	------------------

	OUC ratio		OUC ratio	
dAMP fosfaat alkylatie $t_m = 5.25$ min	0.0019		0.0020 (x 1.0) ^a	
dAMP base alkylatie $t_m = 7.20; 7.75$ min	0.0433	0.0444 ^b	0.2134 (x 4.9) ^a	0.0092 ^b
TMP base alkylatie $t_m = 8.25$ min	0.0467		0.3852 (x 8.3) ^a	
dUMP base alkylatie $t_m = 8.55$ min	0.0131		0.1999 (x 15.2) ^a	
dGMP-N ² alkylatie $t_m = 7.50$ min	0.0083		0.04452 (x 5.3) ^a	
dGMP-N-7 alkylatie $t_m = 8.65$ min	0.0428	0.1949 ^c	0.0271 (x 0.6) ^a	1.6434 ^c
imidazoolring-ge opend dGMP adduct	0.0048		0.0119 (x 2.5) ^a	

^a Relatieve toename van het adduct na SVP-hydrolyse

^b Verhouding van de fosfaatalkylatie tot de basealkylatie

^c Verhouding van de dGMP-N² alkylatie tot de dGMP-N-7 alkylatie

Verder blijkt uit deze gegevens dat er een sterke toename (met een factor 8.43) is in de verhouding tussen het dGMP-N² en dGMP-N-7 gealkyleerde adduct na SVP-hydrolyse. Dit is enerzijds te verklaren door een daling van het dGMP-N-7 gealkyleerde adduct dat door hydrolytische imidazoolring-opening daalt in concentratie terwijl het ring geopende product toeneemt. Dit bevestigt, zoals bepaald werd met CZE-ES-MS/MS dat de alkylatie van dit dGMP-adduct plaats greep op N-7. Anderzijds kan de sterke toename in de verhouding tussen het N² en het N-7 gealkyleerde adduct verklaard worden door een toename van het N² gealkyleerde

adduct dat vastgehouden werd in de dinucleotideadducten. Gezien dit adduct niet gevoelig is aan hydrolytische imidazoolring-opening, bevestigt dit de lokalisatie van de alkylatie op N².

V.5. Besluit

De adducten die gevormd werden tijdens de interactie van PGE met kalfthymus DNA werden geïdentificeerd dankzij het gebruik van CZE-ES-MS en CZE-ES-MS/MS. Van alle belangrijke adducten werden laag energetische CID-productionenspectra opgenomen teneinde hun structuur te bepalen. Teneinde voldoende staal op het capillair te kunnen injecteren om CID-spectra op te nemen werd de in Hoofdstuk III ontwikkelde *on line* "sample stacking" toegepast.

Analyse op agarosegel van het kalfthymus DNA, na verschillende incubatietijden met PGE, toonde aan dat het DNA door reactie met PGE in sterke mate gehydrolyseerd werd. Na tien uur incubatie was zogoed als alle hoogmoleculairgewicht DNA verdwenen. Na precipitatie van het DNA werden in het supernatans met behulp van CZE-analyse een aantal hydrolyseproducten teruggevonden. Semi-kwantitatieve analyse van deze hydrolyseproducten op CZE leerde ons dat deze vooral tijdens de eerste tien uur gevormd werden. Uit eenzelfde analyse van de adducten aanwezig in het enzymatische DNA-hydrolysaat van de DNA-pellet bleek dat de adducten aanwezig in het DNA-hydrolysaat slechts gevormd worden na 10 uur incubatie. Dit wijst erop dat de DNA-structuur eerst verbroken dient te worden zodat deze beschikbaar wordt voor de vorming van de adducten teruggevonden in het enzymatische DNA-hydrolysaat. De identiteit van de producten aanwezig in het supernatans na DNA-precipitatie werd bepaald met behulp van CZE-ES-MS/MS. Uit die analyse blijkt dat de belangrijkste producten fosfaatadducten zijn van PGE. De aanwezigheid van deze PGE-fosfaatadducten wijst op de vorming van fosfotriësters door PGE bij reactie met DNA. De daaropvolgende hydrolyse van de instabiele fosfotriëster vormt breuken in de DNA-streng. Daarbij blijkt de aanwezigheid van een hydroxylgroep in de β -positie deze hydrolyse sterk te versnellen (Conrad et al., 1986). Dit kan een belangrijke waarneming zijn om de cytotoxiciteit van PGE en andere epoxiden te verklaren, gezien alle epoxiden bij adductvorming met de fosfaatgroep aanleiding geven tot een hydroxylgroep in de β -positie.

Ook de adducten aanwezig in het enzymatische DNA-hydrolysaat werden

met behulp van CZE-ES-MS/MS geïdentificeerd. Het merendeel van deze adducten zijn gealkyleerd op de base, slechts een geringe hoeveelheid fosfaatgealkyleerde adducten werden teruggevonden in het DNA-hydrolysaat. Daarnaast werden een belangrijke hoeveelheid gealkyleerde dinucleotiden teruggevonden na hydrolyse met het nuclease P_1 enzyme. Ook hier werd de alkylering gelokaliseerd op de basegroepen. Deze konden met het SVP-enzyme dat minder gevoelig is voor modificaties dan het nuclease P_1 enzyme (Crain, 1990) verder gehydrolyseerd worden tot hun 5-monofosfaatnucleotide adducten. Uit deze analyse blijkt dat gealkyleerde pyrimidines resistenter zijn tegen hydrolyse met het nuclease P_1 dan gealkyleerde purines.

V.6. Referenties

- Bannon P and Verly W. Alkylation of phosphates and stability of phosphate triesters in DNA. *Eur. J. Biochem.* 1972, 31, 103-111.
- Carter CA, Kirk MC and Ludlum DB. Phosphotriester formation by the haloethylnitrosoureas and repair of these lesions by *E. coli* BS21 extracts. *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 5661-5672.
- Chien RL and Burgi DS. Sample stacking of an extremely large injection volume in high-performance capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 1992, 64, 1046-1050.
- Conrad J, Müller N and Eisenbrand G. Studies on the stability of trialkyl phosphates and di-(2'-deoxythymidine) phosphotriesters in alkaline and neutral solution. A model study for hydrolysis of phosphotriesters in DNA and on the influence of a β -hydroxyethyl ester group. *Chem.-Biol. Interact.* 1986, 60, 57-65.
- Crain PF. Preparation and enzymatic hydrolysis of DNA and RNA for mass spectrometry. *Method. Enzymol.* 1990, 193, 782-790.
- Dizdaroglu M. Chemical Determination of Oxidative DNA Damage by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Method. Enzymol.* 1994, 234, 3-16.
- Lemièrè F, Esmans EL, Van Dongen W, Van den Eeckhout E and Van Onckelen H. Evaluation of liquid chromatography-thermospray mass spectrometry in the determination of some phenylglycidyl ether-2'-deoxynucleoside adducts. *J. Chromatogr. A.* 1993, 647, 211-218.
- Lemièrè F, Joos P, Vanhoutte K, Esmans EL, De Groot A, Claeys M and Van den Eeckhout E. Phenylglycidyl ether adducts of 2'-deoxycytidine and 2'-deoxyadenosine: Stability in solution and structure analysis by electrospray tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1996, 7, 682-691.
- Lindemann H and Harbers E. In vitro reaktion der drei alkylierenden pharmaka cyclophosphamid, ifosfamid und trifosfamid mit DNS und DNS bausteinen. *Drug Res.* 1980, 30, 2075-2080.
- Lindemann H. Interaction of cyclophosphamide with DNA in isolated rat liver nuclei. *Anticancer Res.* 1984, 4, 53-58.
- Luo Y, Henle ES, Chatopadhyaya R, Jin R and Linn S. Detecting DNA damage caused by iron and hydrogen peroxide. *Method. Enzymol.* 1994, 234, 51-59.

-
- Maccubbin AE, Caballes L, Riordan JM, Huang DH and Gurtoo HI. A cyclophosphamide/DNA phosphoester adduct formed in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 1991, 51, 886-892.
 - McLuckey SA and Habibi-Goudarzi. Decompositions of multiply charged oligonucleotide anions. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 12085.
 - Norwood CB, Jackim E and Cheer S. DNA adduct research with capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* 1993, 213, 194-199.
 - Saris CP, Damman SJ, Van den Ende AMC, Westra JG and Den Engelse L. A ^{32}P -postlabelling assay for the detection of alkylphosphotriesters in DNA. *Carcinogenesis.* 1995, 16, 1543-1548.
 - Singer B, Sun L and Fraenkel-Conrat A. Effects of alkylation of phosphodiester and of bases on infectivity and stability of Tobacco mosaic virus RNA phosphatase alkylated TMV RNA. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975, 72, 2232-2236.
 - Skibo EB and Schulz WG. Pyrrolo[1,2-a]benzimidazole-based aziridiny quinones. A new class of DNA cleaving agent exhibiting G and A base specificity. *J. Med. Chem.* 1993, 36, 3050-3055.
 - Van den Eeckhout EG. Development of analytical methodology in the structure-genotoxicity relationship of some aliphatic epoxides. Proefschrift voorgelegd tot het verkrijgen van de graad van Geaggregeerde voor het Hoger Onderwijs in de Farmaceutische Wetenschappen. Universiteit Gent. 1991.
 - Vanhoutte K, Joos P, Lemièrre F, Van Dongen W, Esmans EL, Claeys M and Van den Eeckhout E. Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry of the DNA adducts formed between 2'-deoxynucleosides and bisphenol A diglycidyl ether. *J. Mass Spectrom.* 1995, 30, 1453-1461.

Hoofdstuk VI: Onderzoek van de interactie van **platinaverbindingen met DNA.**

VI.1. Literatuuroverzicht

VI.1.1. Adductvorming van cisplatina en platinaverbindingen

Cisplatina (cis-diaminedichloorplatinum(II)) en carboplatina (cis-diamine-1,1-cyclobutaandicarboxylaatchlorplatinum(II)) zijn de twee meest bekende, meest gebruikte en bijgevolg ook de twee componenten waarnaar het meeste onderzoek verricht is van alle platinaverbindingen. Het klinisch gebruik van cisplatina is echter gelimiteerd ten gevolge van de ernstige bijwerkingen: nefrotoxiciteit (Cornelison en Reed, 1993), ototoxiciteit, neurotoxiciteit en ernstige nausea en braken (Boogerd et al., 1990; Blommaert et al., 1995). Een bijkomend probleem is het optreden van primair en secundair resistente tumoren (Sai et al., 1996). Om deze problemen het hoofd te bieden werden de voorbije jaren heel wat cisplatina derivaten gesynthetiseerd (Reedijk, 1996). In het kader van deze zoektocht ontwikkelde Professor Kokotos een aantal nieuwe platinaverbindingen (Kokotos et al., 1997) en werd hun activiteit onderzocht in dit onderdeel van het onderzoekswerk.

Algemeen wordt aangenomen dat de antitumor activiteit van platinaverbindingen te danken is aan hun interactie met DNA (Reedijk, 1987). Daartoe dienen de platinaverbindingen eerst in de cel binnen te dringen waarna ze doorheen het nucleair membraan met het genomisch DNA kunnen reageren. Er bestaat nog steeds discussie over het feit of de opname in de cel gebaseerd is op een passief of een actief transportmechanisme, en sommige auteurs

veronderstellen een gecombineerd mechanisme (Wang K et al., 1996). Vooraleer het cisplatina reageert met het DNA dienen de chloride-liganden gesubstitueerd te worden met de tot 70 keer actievere water-liganden gedurende een hydrolysereactie (Blommaert, 1996). Gezien de hoge extracellulaire chlorideconcentratie (140 mM) wordt in de bloedcirculatie slechts een geringe hoeveelheid chloride-liganden uitgewisseld voor water (3 tot 7%). Intracellulair is de chlorideconcentratie veel lager (4 tot 5 mM) en zal die uitwisseling dus veel meer doorgaan (20 tot 30%).

Platina reageert bij voorkeur met de N-7 van guanine en in tweede instantie met de N-7 van adenine en ook in mindere mate met de N-1 van adenine (Eastman, 1982). Na een initieel monovalent binden van het platina aan de bouwstenen van het DNA gaat de reactie verder tot de vorming van een divalent gebonden platinumadduct (Eastman, 1986). De relatieve hoeveelheden van de verschillende adducten teruggevonden na *in vitro* reactie van DNA met cisplatina (Fichtinger-Schepman et al., 1985) en cis-dichloor(ethyleendiamine)platinum(II) (Eastman, 1986) en enzymatische hydrolyse van het geplatineerd DNA zijn weergegeven in tabel 6.1.

TABEL 6.1: Relatieve hoeveelheid van de cisplatina-DNA adducten zoals bepaald door Fichtinger-Schepman et al. (1985) (kolom A) en door Eastman (1986) (kolom B), bij een molaire input ratio (aantal mol platina over mol nucleotiden) van 0.05. Verdere bespreking zie tekst.

	A (in %)	B (in %)
intrastrand Pt-GG	50	42
intrastrand Pt-AG	28	32
G-Pt-G	10	6
Pt-G	2	NB

oligo-Pt	NB	6
----------	----	---

NB= Niet bepaald

De intrastrand adducten Pt-GG en Pt-AG zijn het resultaat van een initiële monovalente binding met het N-7 van een guanine die vervolgens verder reageert met een naburig guanine of adenine tot de vorming van een divalent gebonden platina-adduct. Bij deze adducten zijn de twee gecomplexeerde nucleosiden (Eastman, 1986) of nucleotiden (Fichtinger-Schepman et al., 1985) nog met elkaar verbonden via een fosfodiësterbinding. Het percentage Pt-GG-adducten (42-50%) is beduidend hoger dan het theoretisch verwachte percentage (36.8%) bij willekeurige adductvorming. Eastman (1986) besluit uit zijn experimenten dan ook dat de platinering, na willekeurige adductvorming op een guanine, over de DNA-streng kan "wandelen" door een verbreken van het initieel gevormde complex.

Het adduct G-Pt-G is het resultaat van de reactie met de N-7 groep van een tweede guanine op dezelfde DNA-streng dat gescheiden is van het eerste guanine door één of meerdere tussenliggende basen (intrastrand). Dit adduct kan ook gevormd worden door reactie met de N-7 van een tweede guanine dat zich bevindt op de complementaire DNA-streng (Eastman, 1986), een dergelijk adduct wordt een interstrand-adduct geheten. Het merendeel van dit adduct (85-90%) zou echter afkomstig zijn van intrastrand-adducten (Zwelling en Kohn, 1979; Plooy et al., 1984).

Het monovalent gebonden platinumadduct Pt-G is een tussenproduct in de vorming van divalente adducten. Dit werd aangetoond in de experimenten van Eastman (1986), waaruit blijkt dat na 16 uur post-incubatie alle monovalente adducten verdwenen zijn uit het reactiemengsel.

Beide auteurs (Eastman, 1986; Fichtinger-Schepman et al., 1985) rapporteren de aanwezigheid van onvolledige hydrolyseproducten die platina bevatten. Ze besluiten dat het hier oligonucleotiden betreft die door de verregaande adductvorming met platina (oligo-Pt) niet meer door enzymatische hydrolyse kunnen

worden afgebroken tot hun bouwstenen.

VI.1.2. Preparatieve CZE

Alhoewel de hoeveelheden staal die bij CZE op een capillair geladen kunnen worden vrij klein zijn (grootteorde femto- tot picomol) omwille van een aantal factoren, als daar zijn: het geringe injectievolume (zie Hoofdstuk II.3.6) en de geringe staalconcentratie, door het optreden van elektrodispersie (zie Hoofdstuk II.4.2.2.), die bruikbaar zijn voor CZE-analyse, bestaat er toch veel interesse om CZE als een preparatieve techniek aan te wenden. Een gedetailleerde theoretische uiteenzetting omtrent deze problematiek werd neergepend door Cifuentes et al. (1995). Gezien de grote interesse werden recent een aantal technieken ontwikkeld om CZE uit te voeren op een preparatieve manier (Müller et al., 1995; Chiu et al., 1995; Lee et al., 1995; Walker et al., 1995; Weinmann et al., 1994).

Een eerste voorwaarde, gerelateerd aan de kleine staalhoeveelheden geïnjecteerd op het capillair (grootteorde femto- tot picomol), is dat de bepaling die uitgevoerd dient te worden op de gecollecteerde fracties voldoende gevoelig dient te zijn. Preparatieve CZE werd met succes uitgevoerd voor de collectie van DNA-fragmenten met daaropvolgende Polymerase Chain Reactie (PCR) vermenigvuldiging van de verzamelde DNA-fragmenten en gelelektroforese detectie (Müller et al., 1995). Ook detectie met behulp van ES-MS en Matrix-Assisted-Laser-Desorption (MALDI)-TOF-MS van proteïnen en peptiden in de verzamelde fracties werd met succes uitgevoerd (Chiu et al., 1995; Walker et al., 1995; Weinmann et al., 1994).

De eerste ontwikkelde preparatieve CZE-systemen waren gebaseerd op het verplaatsen van het capillairuiteinde naar een nieuw collectievaatje telkens wanneer berekend werd dat een bepaalde zone van het capillair zou migreren. Dit principe wordt aangeduid met elektroëlutie en wordt heden ten dage nog veelvuldig aangewend daar deze techniek op de meeste commerciële apparatuur gemakkelijk te implementeren is (Lee et al., 1995). Het grote nadeel van deze techniek is dat de elektroforesestroom, telkens wanneer van vaatje verwisseld wordt, dient uitgezet

te worden wat aanleiding geeft tot onnauwkeurigheden (Müller et al., 1995). Bovendien wordt de staalzone, gezien het relatief grote volume (10 µl en meer) in de collectievaatjes, bij electroëlutie, sterk verdund.

Teneinde de stroom tijdens de fractiecollectie niet te hoeven onderbreken werd door verschillende auteurs gebruik gemaakt van een “sheath”-vloeistof design (Müller et al., 1995; Chiu et al., 1995; Walker et al., 1995; Weinmann et al., 1994), in analogie met de “sheath”-vloeistof design ontwikkeld voor het uitvoeren van CZE-ES-MS (zie Hoofdstuk III). Dergelijke systemen maken de collectie van een groot aantal fracties (tot zestig (Müller et al., 1995)) met een grote precisie mogelijk. Deze precisie is noodzakelijk wanneer dicht bijeen migrerende zones afzonderlijk geïsoleerd dienen te worden.

Teneinde ook het collectievolume zo laag als mogelijk te houden werd het CZE-capillair aan het uiteinde gecoat met een goud houdend epoxyhars (Chiu et al., 1995; Walker et al., 1995). Dit systeem is gebaseerd op de “Sheathless”-methode ontwikkeld voor het uitvoeren van CZE-ES-MS (zie Hoofdstuk III). Ook hier wordt de stroom tijdens de fractiecollectie niet onderbroken en kunnen de fracties met een hoge precisie verzameld worden. Een bijkomend voordeel met de “sheath”-vloeistof techniek is dat de CZE-zones in deze opstelling niet verdund worden in een “sheath”-vloeistof. Deze methode is vooral geschikt voor preparatieve CZE-scheidingen die over een grote EOF beschikken. Preparatieve CZE-scheidingen met geen of slechts een minimale EOF dienen uitgevoerd te worden met de “sheath”-vloeistof techniek (Walker et al., 1995).

VI.2. Inleiding

Het doel van dit laatste hoofdstuk was het onderzoek naar de cytotoxische eigenschappen van een nieuwe groep van vijf aminocoumarineplatina(II)-verbindingen die gesynthetiseerd werden door Professor Kokotos (1997). Een eerste doelstelling was dan ook het nagaan of deze verbindingen cytotoxisch waren en in welke mate. Daartoe werd een *in-vitro* MTT-test uitgevoerd op drie verschillende cellijnen, waarvan één cellijn speciaal geselecteerd werd omdat deze resistent was tegen klinisch relevante concentraties van cisplatina (Wang Z et al., 1996).

Een tweede doelstelling was om na te gaan met behulp van de in Hoofdstuk II op punt gestelde CZE-analyse of er een verband bestond tussen de cytotoxische activiteit van deze aminocoumarineplatina(II)verbindingen en de vorming van DNA-adducten bij incubatie met kalfthymus DNA. Teneinde verder onderzoek te kunnen uitvoeren naar de gevonden DNA-adducten werd een preparatieve CZE-scheiding ontwikkeld, zonder onderbreking van de elektroforese spanning, om met behulp van atomaire absorptie de aanwezigheid van platina in bepaalde CZE-pieken te kunnen aantonen.

Een laatste doelstelling was het bepalen van het reactiemechanisme dat leidde tot de vorming van de platina-DNA-adducten. Teneinde dit onderzoek mogelijk te maken werd één van de actieve aminocoumarineplatina(II) verbindingen geïncubeerd met een zelf-complementair synthetisch hexameer oligonucleotide.

VI.3. Materiaal en methoden

VI.3.1. Chemicaliën

Aan "Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)" (Gibco BRL, Merelbeke) werd 10% foetaal rundserum, 2.0 mM L-glutamine, 250 UI/ml penicilline, 100 µg/ml streptomycine en 10 µg/ml rundsinsuline, alle van Gibco BRL, toegevoegd. De weergegeven waarden zijn de uiteindelijke concentraties. De oplossingen werden steriel aangekocht en alle handelingen werden uitgevoerd in een LAF-kast met in achtname van de aseptische technieken.

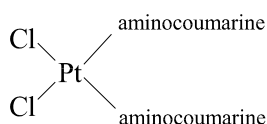
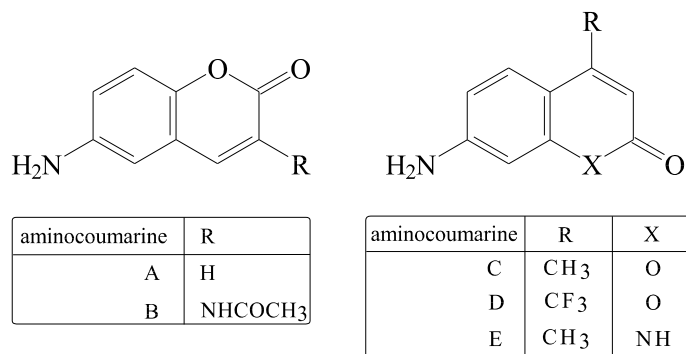
Aan "Minimum Essential Medium (MEM)" bevattende "Earle's Salts" (Gibco BRL, Merelbeke) werd 10% foetaal rundserum, 2.0 mM L-glutamine, 250 UI/ml penicilline en 100 µg/ml streptomycine, alle van Gibco BRL, toegevoegd.

Aan "Roosevelt Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)" medium bevattende 1.5 g/l natrium bicarbonaat, 4.5 g/l glucose en 10 mM HEPES werd 20% foetaal rundserum, 1.0 mM natrium pyruvaat, 2.0 mM L-glutamine en 10 µg/ml rundsinsuline, alle van Gibco BRL, toegevoegd.

Cis-diaminedichloorplatina(II) (CDDP), DMSO, DNA type I van kalfthymus, deoxyribonuclease I (DNAase I, EC 3.1.21.1), nuclease P₁ (EC 3.1.30.1), het tetrazolium zout MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeny-tetrazolium bromide], isopropanol en ammoniumcarbonaat werden bekomen bij Sigma (St. Louis, MO, VS). "Phosphate Buffered Saline pH 7.4 (PBS)", "Hanks' Balanced Salts W/O calcium and magnesium (HBBS)" en trypsine (0.5 g/l) - EDTA (0.2 g/l) oplossing in "Modified Puck's Saline A" werden bekomen bij Gibco BRL, Merelbeke. "Phosphodiesterase I van *Crotalus adamanteus* Venom" (SVP) en Sephadex G-25 M gelfiltratiekolommen waren van Pharmacia Biotech (Uppsala, Zweden). Thioureum was van Acros organics (Geel, België).

De aminocoumarineplatina(II) verbindingen en de aminocoumarineliganden (figuur 6.1) werden ons bezorgd door Prof. Dr. G. Kokotos (University of Athens, Griekenland) die deze componenten synthetiseerde (Kokotos et al., 1997). Het water was van HPLC-kwaliteit en werd bekomen door zuivering van gedestilleerd

water met het Milli-Q Reagent Grade waterzuiveringssysteem (Millipore, Bedford, MA, VS). Dit water werd voor gebruik geautoclaveerd. Alle gebruikte chemicaliën en solventen waren van *pro analysi* kwaliteit.



aminocoumarine	aminocoumarine platina (II) complex	MG
A	cis-dichloro-di(6-aminocoumarine)-platina (II)	588.31
B	cis-dichloro-di(3-acetamido-6-aminocoumarine)-platina (II)	702.41
C	cis-dichloro-di(7-amino-4-methylcoumarine)-platina (II)	616.36
D	cis-dichloro-di(7-amino-4-trifluoromethylcoumarine)-platina (II)	724.30
E	cis-dichloro-di(7-amino-4-methyl-quinolin-2-one)-platina (II)	614.34

VI.3.2. Bepaling van de cytotoxiciteit van de platinaverbindingen

De cytotoxiciteit en de cytostaticiteit van de aminocoumarineplatina(II) complexen en hun respectieve aminocoumarineliganden werden geëvalueerd met behulp van de MTT-test. Deze test is gebaseerd op de enzymatische reductie, onder invloed van het succinaat dehydrogenase in de mitochondriën, van het tetrazoliumzout MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeny-tetrazolium bromide] naar zijn formazanvorm. Deze enzymatische reductie gaat enkel door in levende, metabolisch actieve cellen, en niet in dode cellen (Romijn et al., 1988; Maarouf et al., 1997; Rekka et al., 1996). Het tijdens deze reductie gevormde formazan is onoplosbaar in water en is sterk blauw gekleurd. De MTT-test werd uitgevoerd op verschillende cellijnen: de Caco-2T cellijn die afgeleid is van een Caco-2 cultuur,

zijnde een menselijke colorectale kanker, die getransfecteerd werd met een geactiveerd humaan HA-ras oncogen (Chastre et al., 1993); de SKBR-3 cellijn die afkomstig is van een menselijke borstkanker (Gercel-Taylor et al., 1996) en de OVCAR-3 cellijn, die afkomstig is van een humaan ovariumadenocarcinoom. Deze laatste cellijn werd geselecteerd omwille van zijn resistentie tegen klinisch relevante concentraties van een aantal chemotherapeutica waaronder cisplatina (Wang Z et al., 1996; Siler et al., 1996). Deze drie cellijnen zijn alle adherent, wat betekent dat ze mono-layer culturen vormen.

De cellen worden elk in hun geëigende medium in cultuur gehouden (zie Tabel 6.2) in een broedstoof (Napco, Precision Scientific, Chicago, VS) bij 37°C, 5% CO₂ en een relatieve vochtigheid van 95%. Wanneer de cultuurflessen volgroeid waren (na een vijftal dagen) werd het medium verwijderd en werden de cellen na wassen met HBBS losgeweekt met behulp van een trypsine (0.5 g/l) - EDTA (0.2 g/l) oplossing. Na suspenderen werden de cellen in de gewenste verdunning (1 op 5) weer in cultuur gebracht in hun medium. Alle manipulaties werden uitgevoerd in een LAF-kast, alle glaswerk, plastic- en andere recipiënten evenals de plastic pipetpunten werden voor gebruik geautoclaveerd.

Tabel 6.2: Cultuurmedia gebruikt in de cultuur van de kankercellijnen.

Cellijn	Cultuurmedium
Caco-2T	aangevuld DMEM medium
SKBR-3	aangevuld MEM medium
OVCAR-3	aangevuld RPMI 1640 medium

De aminocoumarines werden enkel getest op de Caco-2T cellijn, daartoe werden stockoplossingen bereid van de desbetreffende aminocoumarines (1 mg/ml in 7.5% DMSO, 92.5% aangevuld DMEM). Een verdunningsreeks (van 0 tot 200

µg/ml uiteindelijke concentratie in de kuipjes) werd aangelegd in aangevuld DMEM.

CDDP werd getest op de SKBR-3 en OVCAR-3 cellijn, daartoe werd, uitgaande van een stockoplossing (1 mg/ml in 20% DMSO, 80% passend medium), een verdunningsreeks van 0 tot 100 µg/ml (uiteindelijke concentratie in de kuipjes), bereid in het passende cultuurmedium.

De aminocoumarine platina (II) complexen werden getest op de Caco-2T en SKBR-3 cellijn. De twee componenten met een activiteit vergelijkbaar aan die van CDDP, zijnde cis-dichloor-di(6-aminocoumarine)-platina(II) (CDAP) en cis-dichloor-di(7-amino-4-trifluormethyl coumarine)-platina(II) (CDATP), werden eveneens getest op de OVCAR-3 cellijn. Daartoe werden stockoplossingen bereid van de desbetreffende aminocoumarineplatina(II) complexen (1 mg/ml in 15% DMSO, 85% passend medium). Een verdunningsreeks van 0 tot 100 µg/ml (uiteindelijke concentratie in de kuipjes) werd bereid in het passende cultuurmedium.

Alle stockoplossingen en verdunningsreeksen werden onmiddellijk voor het starten van de MTT-test bereid in het passende medium. Er werd tevens voor gezorgd dat iedere verdunning een eindconcentratie van 1.5% DMSO bezat, daar DMSO ook een intrinsieke cytostaticiteit bezit. Ook in de blanco kuipjes werd aan het medium DMSO toegevoegd in een uiteindelijke concentratie van 1.5%.

100 µl van de gewenste celsuspensie werd aan een concentratie van ongeveer 150 000 cellen/ml uitgezaaid in 88 kuipjes van een 96-kuipjes microtiterplaat, in 8 kuipjes werd enkel medium zonder cellen toegevoegd teneinde een mediumcorrectie te kunnen uitvoeren. De platen werden gedurende 4 uur geïncubeerd bij 37°C in de broedstoof (bij 5% CO₂ en een relatieve vochtigheid van 95%) zodat de cellen zich konden vasthechten aan de bodem. Vervolgens werd 100 µl van de verdunningsreeks van de te testen component toegevoegd waarbij voor iedere verdunning 8 kuipjes gebruikt werden. Na 4 dagen incubatie in de broedstoof (37°C, 5% CO₂ en RV 95%) werd uit iedere kuipje 100 µl medium verwijderd en 100 µl MTT-oplossing ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeny-tetrazolium bromide] 1mg/ml in PBS-buffer) toegevoegd. Na twee uur incubatie bij 37°C waarbij in de metabolisch actieve cellen formazankristallen werden gevormd, werd het medium

zoveel als mogelijk verwijderd er zorg voor dragend geen van de neergeslagen blauwe kristallen te verwijderen. Na oplossen en homogeniseren van deze kristallen in 200 μ l DMSO werden de UV-absorpties bij 490 nm bepaald met behulp van een Ceres UV 900 spectrofotometer (Bio-Tek Instruments).

VI.3.3. Reactie van de platinaverbindingen met DNA

Het kalfthymus DNA werd opgelost in HPLC-water aan een concentratie van 10 mg/ml. Aan 100 μ l aliquots van deze oplossing werd 100 μ l van de aminocoumarineplatina(II) complexen (1 mg in 1 ml DMSO) toegevoegd. Dit resulteerde in een geneesmiddel : nucleotide molaire inputratio van 0.05. Verder werden eveneens variërende concentraties van CDAP (inputratio van 0.01 tot 0.1) en van CDDP (inputratio van 0.01 tot 0.2) gereageerd met 100 μ l aliquots van de DNA-oplossing. De stalen werden gedurende 48 uur geïncubeerd in het donker, bij 37°C, onder licht schudden. De reacties werden beëindigd door de stalen tweemaal te extraheren met 300 μ l chloroform, waarbij DMSO verwijderd werd. Vervolgens werd het DNA uit de waterfase geprecipiteerd door toevoegen van natriumacetaat 0.3 M en ethanol 70%. Na 1 uur incubatie bij -20°C werd het geprecipiteerde DNA afgecentrifugeerd gedurende 15 minuten bij 12.000 g in een gekoelde centrifuge (4°C). De DNA-pellet werd daarna opgelost in 400 μ l hydrolysebuffer (20 mM Tris/HCl, 50 μ M CaCl₂ en 2.25 mM MgCl₂, pH 7.5) en na toevoegen van 200 U DNAasel werd dit mengsel gedurende 12 uur geïncubeerd bij 37°C in het donker. Vervolgens werden 8 μ l van een 1M natriumacetaatoplossing (pH 5.2) en 4 U nuclease P₁ toegevoegd en werd de incubatie gedurende 6 uur verder gezet bij 37°C in het donker.

Aan 100 μ l aliquots van deze stalen werd bovenop de nuclease P₁ hydrolyse, ook een hydrolyse met het SVP-enzyme uitgevoerd. Zoals reeds besproken in hoofdstuk V is het SVP-enzyme minder gevoelig voor structurele wijzigingen aan de DNA-molecule dan het nuclease P₁ enzyme en kan het in bepaalde gevallen waar nuclease P₁ aanleiding geeft tot onvolledige hydrolyse alsnog aanleiding geven tot volledige hydrolyse. Daartoe werd aan de aliquots 4 μ l ammoniumhydroxide (0.74 M)

en 20 µl SVP (0.4 U/ml) toegevoegd en werden ze gedurende 5 uur geïncubeerd bij 37°C in het donker.

VI.3.4. Gelfiltratie

Het bed volume van de Sephadex G-25 M kolommen werd gereduceerd tot 1 ml teneinde een betere compatibiliteit te bekomen met de hier gebruikte kleine volumina. De kolommen werden voor gebruik gewassen met 5 ml steriel HPLC-water. De DNA-hydrolysaten werden voor applicatie op de kolommen gedurende 5 minuten gekookt teneinde de enzymen te denatureren en de hydrolyse stop te zetten. De proteïneaggregaten die ontstonden na het opkoken werden eerst verwijderd door centrifugatie (5 minuten bij 12.000 g). Vervolgens werd 100 µl van het DNA-hydrolysaat op de kolom gebracht en geëluëerd met steriel HPLC-water waarbij het eluaat in fracties van 100 µl opgevangen werd. In totaal werden telkens twaalf fracties van 100 µl opgevangen (elutievolumes 0.1 tot 1.2 ml). De UV-absorptie bij 260 nm van deze fracties werd bepaald op een Lambda 15 UV/VIS-spectrofotometer van Perkin Elmer (Norwalk, CT 06859, VS) teneinde een idee te krijgen van de concentratie aan nucleotiden in deze stalen.

VI.3.5. Deplatinering met thiourem

Een 100 µl aliquot van het DNA-hydrolysaat van het reactiemengsel met CDAP werd onderworpen aan de gelfiltratieprocedure zonder voorafgaandelijk opkoken. Een tweede aliquot van 100 µl van dit DNA-hydrolysaat werd wel opgekookt voor gelfiltratie. In het niet-opgekookte staal bleef de enzymatische activiteit van de DNA-hydrolyserende enzymen behouden, terwijl in het opgekookte staal alle enzymen gedenatureerd zijn. Vervolgens werd aan de beide hoogmoleculairgewichtsfractionen (elutievolume 0.4 ml) bekomen na gelfiltratie van het opgekookte en het niet-opgekookte staal, 100 µl thiourem oplossing (2 M) toegevoegd en werden de stalen gedurende 16 uur geïncubeerd bij 37°C.

Incubatie met thiourem aan een concentratie van 1 M, leidt tot een omkering van de platina complexering aan DNA, daar platina een grotere affiniteit vertoont voor complexvorming met thiourem dan met de nucleotiden (Filipski et al., 1979).

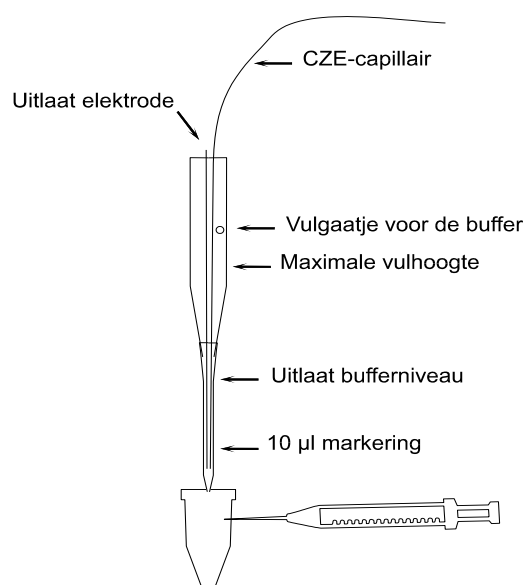
Hierbij wordt het DNA weer vrijgesteld uit het complex zonder enige waarneembare afbraak van het DNA.

VI.3.6. Analyse met CZE

De CZE-analyses werden uitgevoerd met de in Hoofdstuk II op punt gestelde analyseparameters. Het capillair met een i.d. van 75 μm had een totale lengte van 92.5 cm en de afstand tussen het injectieuiteinde en de UV-detector bedroeg 61.5 cm. UV-detectie werd uitgevoerd bij een golflengte van 270 nm. Het capillair werd gethermostatiseerd bij 30°C. Als elektroforesebuffer werd een ammoniumcarbonaatbuffer (pH 9.68) met een concentratie van 100 mM aangewend. De stalen werden geconcentreerd op het capillair door het uitvoeren van de in Hoofdstuk II beschreven “sample stacking”-procedure na injectie bij 120 mbar gedurende 12 seconden. Na deze “sample stacking” werd de elektroforese gestart door het aanbrengen van een spanningsverschil van 17 kV over het capillair.

VI.3.7. Preparatieve CZE

Teneinde preparatieve CZE te kunnen uitvoeren werd een "fused silica" capillair met een i.d. van 75 μm en een totale lengte van 81.5 cm aangewend. De afstand tussen het injectieuiteinde en de UV-detector bedroeg 56.5 cm. De polyimide coating werd aan beide uiteinden verwijderd. Aan het capillair uiteinde werd met behulp van twee plastic wegwerppipetpunten en een Eppendorf-cupje met deksel een systeem gebouwd (figuur 6.2) dat fractiecollectie toelaat zonder dat de elektroforetische stroom onderbroken dient te worden (Deforce et al., 1998).



De bovenste pipetpunt is een punt voor 1 ml-volumina (van het type dat past op Gilson pipettors), in de zijwand van deze punt werd met behulp van een scalpelmesje een gaatje gemaakt dat moet dienen om de buffer in de punt te brengen. Dit gaatje wordt aangeduid als het "Vulgaatje voor de buffer". Verder werd de top van de punt verwijderd teneinde de opening voldoende groot te maken zodat het capillair en de elektrode erdoor zouden kunnen. Over de top van deze eerste pipetpunt werd een pipetpunt voor volumina van 10 μl (van het type dat past op Socorex pipettors) geschoven. Op de zijwand van deze punt werd een markering aangebracht overeenkomende met 10 μl . Het uiteinde van het capillair en de punt

van de elektrode werden op gelijke hoogte onder deze 10 μ l markering gebracht. De top van deze laatste pipetpunt werd gepast in het gaatje dat gemaakt werd in het deksel van een Eppendorf-cupje. De elektroforesebuffer werd vervolgens via het vulgaatje in de tips gebracht tot het "maximale vulhoogte" niveau. Na het spoelen van het capillair met elektroforesebuffer werd de buffer in de tip op het niveau gemarkeerd als "uitlaat bufferniveau" gebracht door met behulp van een spuit de luchtdruk in het Eppendorf-vaatje te verlagen. Vervolgens werd het staal op het capillair geïnjecteerd (120 mbar gedurende 12 sec) en werd na het uitvoeren van de "sample stacking"-procedure (zoals beschreven in hoofdstuk II) de elektroforese gestart. Gebruikmakend van formule (15) (Chiu et al., 1995; Müller et al., 1995) kan berekend worden wanneer een component het capillairuiteinde bereikt (t_u) op basis van de tijd wanneer hij de detector voorbijkomt (t_m):

(15) **Fout!**

Waarin l de capillairlengte voorstelt van injectie tot detectie en L de totale capillairlengte. Net voor de fractie die gecollecteerd diende te worden, het capillairuiteinde bereikte werd de elektroforesebuffer driemaal gevuld tot het maximale niveau en geleidigd tot het uitlaat bufferniveau teneinde het systeem te reinigen. Wanneer de eigenlijke collectie gestart werd, werd het bufferniveau in de tip gebracht op de 10 μ l markering en werd een nieuw Eppendorf-cupje geplaatst onder de tip. De zone die de te collecteren piek bevat werd dan in dit volume gecollecteerd en overgebracht in het nieuwe cupje. De gecollecteerde fracties werden vervolgens geanalyseerd op ZAAS.

VI.3.8. ZAAS

Atomaire absorptie-experimenten werden uitgevoerd op een Zeeman/3030 atomaire absorptiespectrofotometer met grafietoven van Perkin Elmer (Norwalk, CT 06859, VS). De 265.9 nm emissieband van een platina holle kathodelamp (Cathodeon, Cambridge, Engeland) werd geselecteerd met een slitbreedte van 0.7 nm. Alle chemicaliën gebruikt voor het uitvoeren van ZAAS waren van AAS-kwaliteit

en het water dat gebruikt werd was bi-gedestilleerd (bidest). Teneinde een ijklijn op te stellen werden twee standaarden (25.0 µg platina/l en 75.0 µg platina/l in 0.2% HNO₃) bereid uitgaande van een stockoplossing (1 mg platina/l) van hexachloorplatina (IV) zuur (H₂PtCl₆).6H₂O in bidest water. De te onderzoeken stalen werden, indien nodig, verdund in bidest water. Het programma dat gebruikt werd voor de ZAAS bepaling is weergegeven in tabel 6.3. Tijdens stap 5 werd de eigenlijke meting uitgevoerd en stap 6 werd uitgevoerd om de oven te reinigen. Het ZAAS-toestel beschikt over een staalcarrousel en een auto-injector, van waaruit de standaarden en de blanco's werden geïnjecteerd (20 µl per injectie). De onbekende stalen werden manueel met behulp van een 10 µl pipet rechtstreeks in de oven geïnjecteerd.

Tabel 6.3: Programma gebruikt voor het uitvoeren van ZAAS bepaling van platina.

Stap	Oven temperatuur (°C)	Tijd om temperatuur te bereiken (sec.)	Temperatuur vasthouden gedurende (sec.)	Gasstroom door oven
1	80	5	20	aan
2	160	5	15	aan
3	500	10	10	aan
4	1300	20	20	aan
5	2500	0	5	af
6	2700	6	6	aan

VI.3.9. Bepaling van de reactieproducten van de platinaverbindingen met oligonucleotiden met behulp van CZE-ES-QTOF.

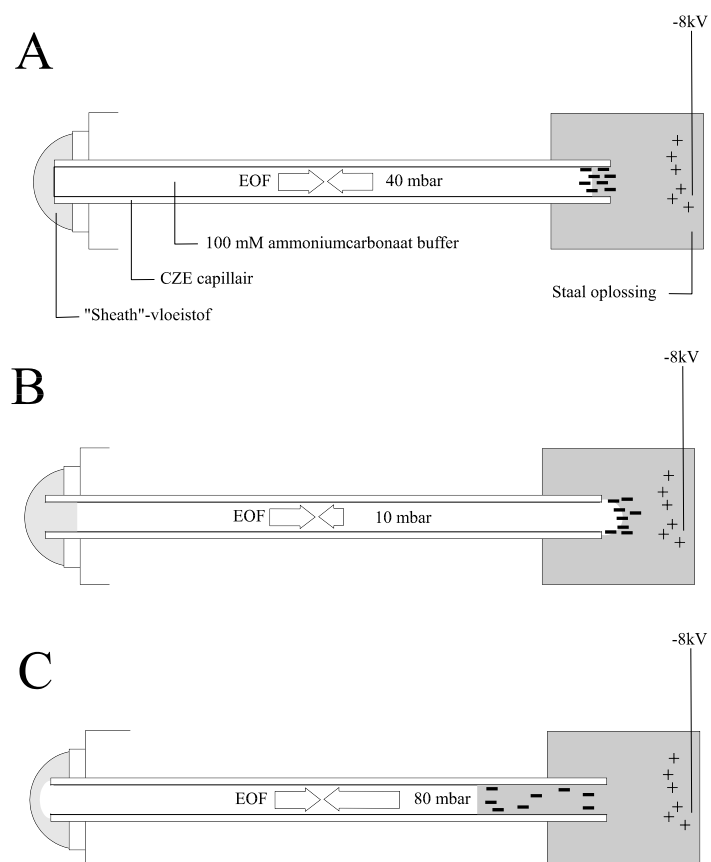
Teneinde meer informatie te bekomen omtrent de complexvorming tussen

CDAP en DNA, werd een model oligonucleotide gesynthetiseerd. Dit hexameer oligonucleotide met de sequentie pApGpGpCpCpT werd gesynthetiseerd door Perkin Elmer (Cheshire, Engeland) en is zelf-complementair. Dit betekent dat dit oligonucleotide bij temperaturen lager dan zijn smelttemperatuur ($T_m = 20.0^\circ\text{C}$) een duplex of dubbelstreng vormt. Als referentiecomponent werd CDDP geselecteerd. Aan 500 μl aliquots van het hexameer, bevattende 360 nmol oligonucleotide in HPLC-water, werd 150 μl CDAP-oplossing (200 nmol in 150 μl DMSO) of 150 μl CDDP-oplossing (200 nmol in 150 μl DMSO) toegevoegd. Vervolgens werden de stalen gedurende 48 uur geïncubeerd bij 4°C in het donker. Deze lage temperatuur werd gekozen daar deze onder de smelttemperatuur van het oligonucleotide is gelegen en het hexameer bij die temperatuur als dubbelstreng voorkomt. De reacties werden beëindigd door de stalen tweemaal te extraheren met 500 μl chloroform, waarbij DMSO verwijderd werd. De oligonucleotiden werden vervolgens geanalyseerd met behulp van CZE-ES-QTOF.

VI.3.9.1. CZE-ES-QTOF

Gezien de grotere gevoeligheid van het CZE-ES-QTOF-systeem ten opzichte van de conventionele CZE-ES-MS (Deforce et al., 1998b) technologie werd voor de bepaling van de reactiemengsels van het oligonucleotide geopteerd voor het CZE-ES-QTOF-systeem (zie Hoofdstuk III). De koppeling van CZE aan ES werd uitgevoerd zoals beschreven in hoofdstuk III van dit proefschrift. Gebruikmakend van een normale injectie, zonder “sample stacking”, kan maximaal 22 nl geïnjecteerd worden (22 mbar gedurende 12 sec, zie hoofdstuk II). Voor een staal met een concentratie van 10^{-5} M zou dit betekenen dat 0.22 pmol oligonucleotide werd geïnjecteerd. Teneinde voldoende staal te kunnen injecteren op het capillair werd voor deze toepassing een nieuwe “sample stacking”-techniek ontwikkeld, die gemakkelijk te implementeren is en die niet vereist dat de “sheath”-vloeistof tijdens de “sample stacking” omgeschakeld dient te worden (zie hoofdstuk III van dit proefschrift). Zodoende werd de procedure eenvoudiger en kon de analysetijd ingekort worden (Deforce et al., 1998b).

De te onderzoeken stalen werden voor injectie verdund (1 op 1) in een ammoniumcarbonaatbuffer (10 mM, pH 9.68). Tijdens het uitvoeren van de “sample stacking”-procedure werd de spanning in de ionisatiebron uitgezet, daar de negatieve potentiaal aan het capillairuiteinde in de bron de injectie van de negatief geladen oligonucleotiden tegenwerkt. Het capillair werd gevuld met de elektroforesebuffer (0.1 M ammoniumcarbonaat, pH 9.68), en de “sample stacking” werd uitgevoerd door gelijktijdig een drukverschil van ongeveer 40 mbar aan te brengen op het capillair en een spanningsverschil van -8 kV, en dit gedurende 1 minuut. De negatieve spanning concentreert de oligonucleotiden uit het staal aan de buffergrenszone, terwijl de druk zorgt voor een compensatie van de EOF die veroorzaakt wordt door het spanningsverschil van -8 kV. Gezien beide krachten een stroom van vloeistof willen veroorzaken in tegengestelde zin, is de netto-vloeistofstroom beperkt en wordt er slechts een kleine hoeveelheid staaloplossing geïnjecteerd. Daar de stalen opgelost zijn in een buffer met een elektrolytconcentratie die een factor 10 lager is dan die van de elektroforesebuffer, zou injectie van een grotere staalplug aanleiding geven tot de vorming van luchtballen in het capillair wanneer de elektroforesespanning zou worden aangelegd. Dit verschil in elektrolytconcentratie is echter van primordiaal belang om de “sample stacking”-procedure te kunnen uitvoeren.



De kritische parameters en de efficiëntie van deze “sample stacking”-techniek werden met behulp van UV-detectie geëvalueerd. Integratie van het UV-signaal werd aangewend om na te gaan hoeveel staal geïnjecteerd werd. Voor een injectiespanning van -8 kV werd nagegaan hoeveel druk nodig was om de EOF te compenseren die door deze spanning veroorzaakt werd (figuur 6.3) daartoe werd de stroom die door het capillair vloeide gevolgd op het CZE-toestel. Als de aangelegde druk te hoog is dan wordt er staaloplossing, met een lagere geleidbaarheid, geïnjecteerd op het capillair en bijgevolg daalt daardoor geleidelijk de stroom (figuur 6.3 C). Wanneer na een dergelijke injectie de elektroforese gestart wordt dan zal de grote staalplug aanleiding geven tot de vorming van luchtbellen in het capillair. Daartegenover staat dat wanneer de druk te laag is de oligonucleotiden niet in het capillair geïnjecteerd worden omwille van de te sterke EOF (figuur 6.3 B). Bovendien wordt in dat geval, bij koppeling aan ES, “sheath”-vloeistof in het capillair gezogen wat gezien de extreem lage geleidbaarheid van de “sheath”-vloeistof aanleiding geeft tot een scherpe stroomval. De mogelijkheid van het CZE-toestel om de stroom gegenereerd tijdens de injectie te volgen liet ons toe de benodigde tegendruk semi-automatisch te optimaliseren. Het CZE-toestel werd daartoe geprogrammeerd om de druk telkens met 2 mbar te verlagen wanneer de stroom daalde met 1 μ A. De procedure werd dan gestart met een initiële tegendruk van 45 mbar, waarna het CZE-toestel automatisch de druk liet dalen tot het niveau nodig om de EOF te compenseren (dit bedroeg gemiddeld 40 mbar, figuur 6.3 A). Deze injectieprocedure werd uitgevoerd gedurende 1.2 minuten wat resulteerde in de injectie van 22 pmol oligonucleotide uit een staal met een concentratie van 10^{-5} M, wat in vergelijking met de normale injectie een factor 100 meer is. Daar, onder deze omstandigheden slechts een kleine plug staaloplossing wordt geïnjecteerd kon hierna zonder problemen de elektroforese uitgevoerd worden.

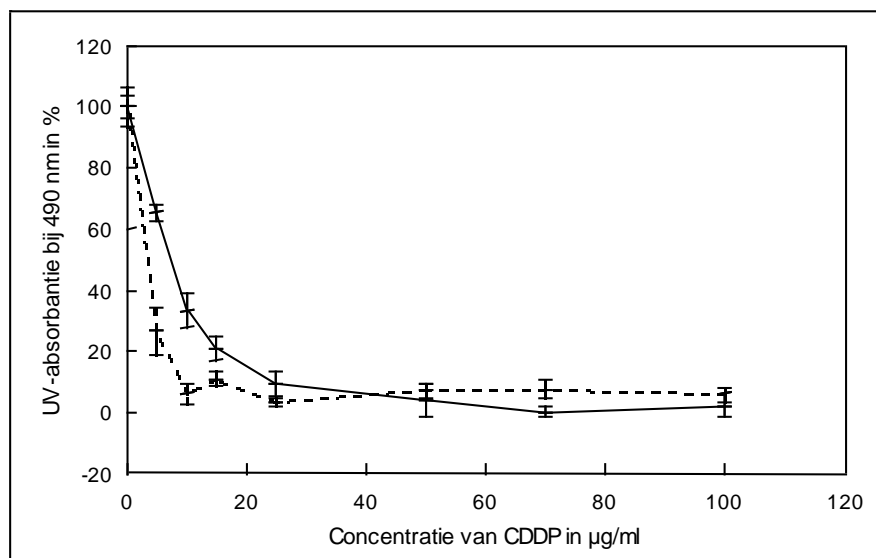
Na het uitvoeren van de “sample stacking”-procedure werden de spanningen in de elektropraybron weer aangezet en werd de elektroforese als volgt uitgevoerd: een spanningsverschil van 8.7 kV gedurende 2 minuten, 10.7 kV gedurende 2 minuten gevolgd door 13.7 kV tot het einde van de analyse.

Gedurende de elektroforese werd een constant drukverschil van 60 mbar aangelegd over het capillair, dit ten einde de analysetijden te verkorten (minder dan 10 minuten). Het gebruiken van een drukverschil geeft uiteraard aanleiding tot een sterk verlies in resolutie, maar de CZE-scheiding is in deze analyses van ondergeschikt belang aan de massabepaling met de QTOF. De elektroforese wordt hier in de eerste plaats uitgevoerd om de metaalionen (natrium, magnesium), die de massaspectrometrische bepaling van oligonucleotiden sterk bemoeilijken (Muddiman et al., 1996; Limbach et al., 1995; Greig en Griffey, 1995), uit te wisselen voor ammoniumionen.

VI.4. Resultaten en bespreking

VI.4.1. Cytotoxiciteit van de platinaverbindingen

Teneinde een referentiekader te creëren voor de besluitvorming omtrent de activiteit van de aminocoumarineplatina(II) complexen werd de cytotoxiciteit bepaald van CDDP met behulp van de MTT-test zoals beschreven in Hoofdstuk VI.3.2. In figuur 6.4 is dosis-responscurve weergegeven voor CDDP in de cellijnen SKBR-3 en OVCAR-3. Ieder punt van de curve is het gemiddelde van 8 metingen bij die dosis, de standaarddeviatie rond ieder gemiddelde is eveneens weergegeven.



Uit deze gegevens blijkt dat de ID₅₀ waarde van CDDP in deze beide cellijnen gelijkwaardig is en 5.69 ± 2.56 µg/ml bedraagt. Dit is enigszins verwonderlijk daar de OVCAR-3 cellijn gerapporteerd wordt als zijnde resistent tegen klinische dosissen van CDDP (Wang Z et al., 1996; Siler et al., 1996). Uit onze gegevens blijkt zo goed als geen verschil in gevoeligheid te bestaan tussen de OVCAR-3 cellijn en de SKBR-3 cellijn ten opzichte van CDDP.

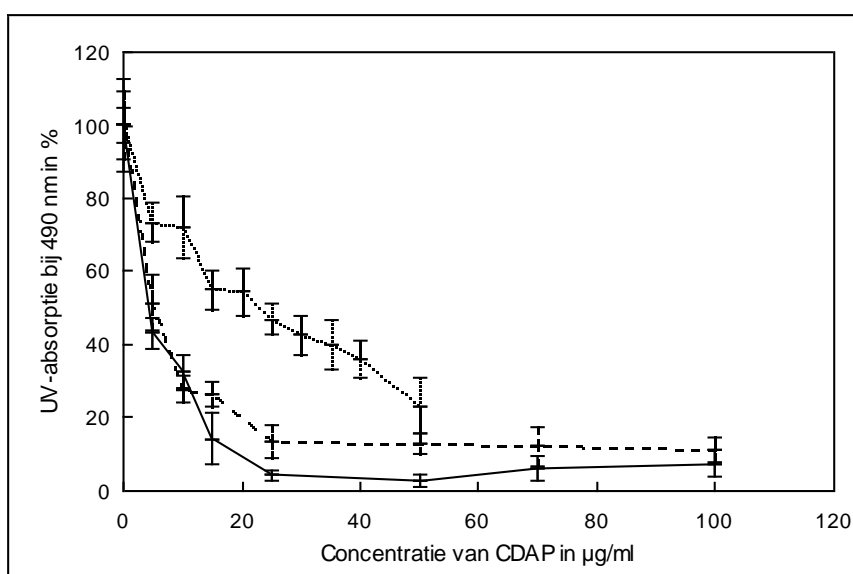
Teneinde de activiteit van de hier onderzochte componenten onderling te kunnen vergelijken werd de ID₅₀ waarde omgerekend naar zijn equivalent uitgedrukt

in molair (IC_{50}), die voor CDDP $18.97 \pm 8.53 \mu M$ bedraagt.

VI.4.1.1. Cytotoxiciteit van cis-dichloor-di(6-aminocoumarine)-platina (II)

CDAP

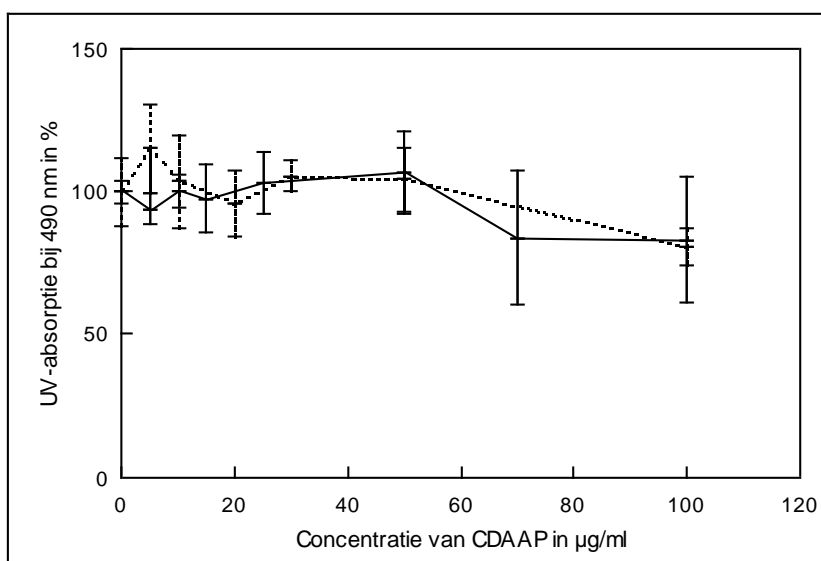
De dosis-responscurve voor CDAP in de cellijnen Caco-2T, SKBR-3 en OVCAR-3, bepaald met behulp van de MTT-test zoals beschreven in Hoofdstuk VI.3.2., is weergegeven in figuur 6.5. De IC_{50} waarde voor de cellijnen SKBR-3 en OVCAR-3 is gelijkwaardig en bedraagt $9.48 \pm 2.86 \mu M$. De IC_{50} waarde bekomen op de Caco-2T cellijn ligt beduidend hoger, $35.10 \pm 10.44 \mu M$, wat erop wijst dat deze cellijn minder gevoelig is voor CDAP.



De cytotoxiciteit van CDAP is dus nagenoeg een factor twee hoger in vergelijking met de activiteit van CDDP. Het aminocoumarineligand van deze component, 6-aminocoumarine, bleek geen cytotoxische activiteit te vertonen over het geteste dosagegebied van 0 tot 200 $\mu g/ml$ (MTT-test uitgevoerd zoals beschreven in Hoofdstuk VI.3.2. op de Caco-2T cellijn).

cis-dichloor-di(3-acetamido-6-aminocoumarine)-platina (II) CDAAP

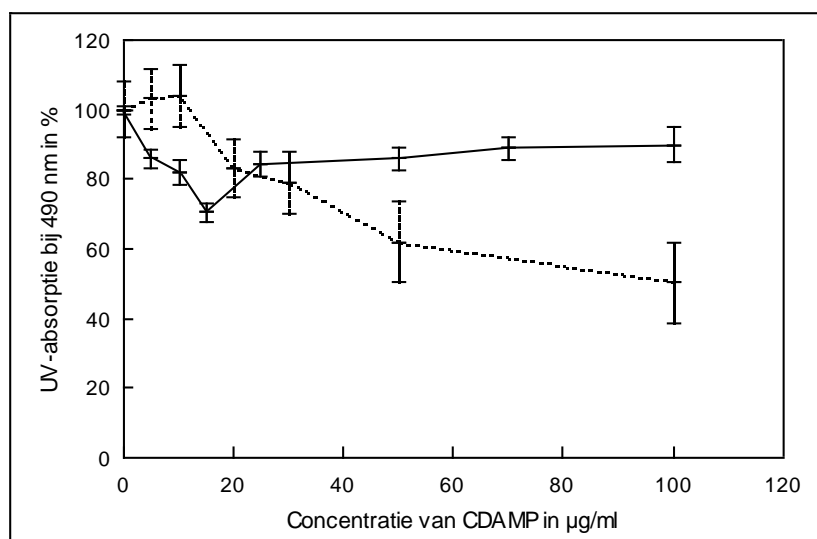
Zoals blijkt uit de dosis-responscurve voor CDAAP (figuur 6.6) vertoont deze component geen cytotoxische activiteit ten opzichte van de hier geteste cellijnen (Caco-2T en SKBR-3) over het onderzochte dosagegebied (0 tot 100 $\mu\text{g/ml}$).



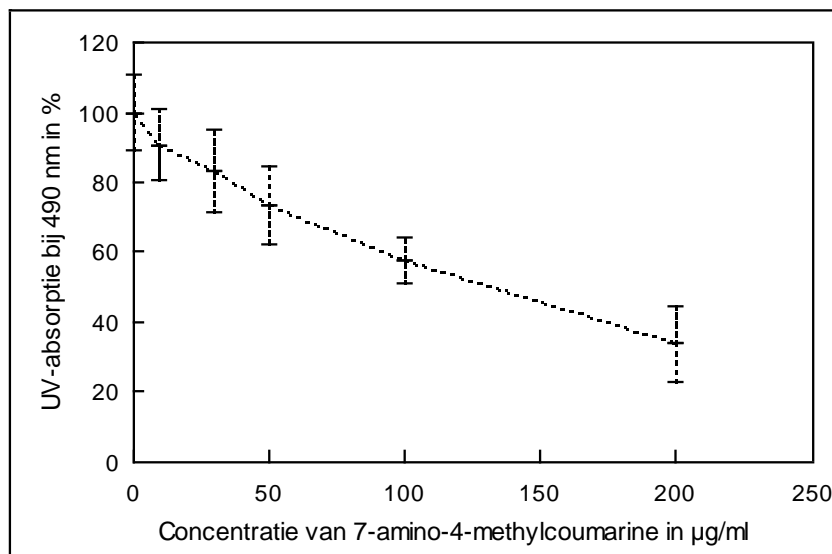
Ook het aminocoumarineligand van CDAAP, 3-acetamido-6-aminocoumarine, bleek over het geteste dosagegebied (0 tot 200 $\mu\text{g/ml}$) geen cytotoxische activiteit te vertonen.

VI.4.1.3. Cytotoxiciteit van
cis-dichloor-di(7-amino-4-methylcoumarine)-platina (II) CDAMP

Uit de dosis-responscurve voor CDAMP (figuur 6.7) blijkt dat deze component geen cytotoxische activiteit vertoont ten opzichte van de SKBR-3 cellijn over het onderzochte dosagegebied (0 tot 100 $\mu\text{g/ml}$). De IC_{50} waarde van $162.24 \pm 76.75 \mu\text{M}$, bekomen op de Caco-2T cellijn, wijst op een lage cytotoxische activiteit van deze component.



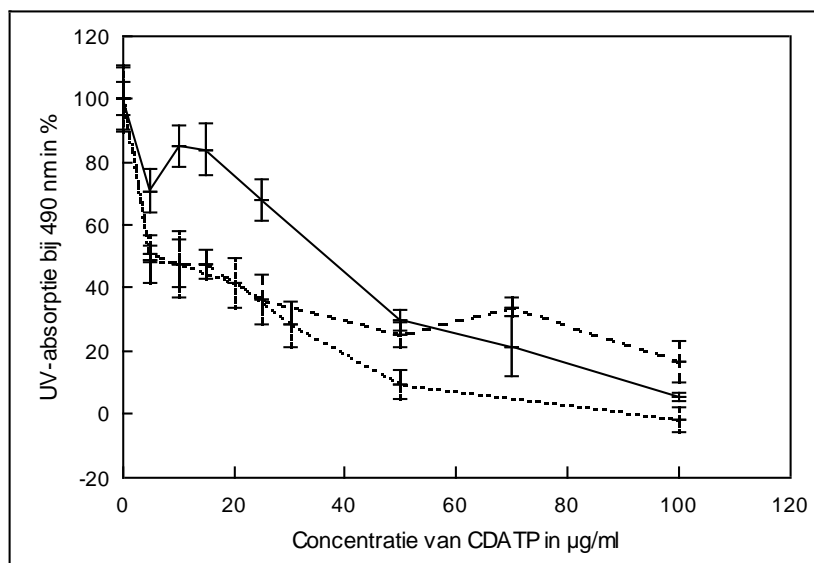
Zoals blijkt uit de dosis-responscurve (figuur 6.8) van het aminocoumarineligand van CDAMP, 7-amino-4-methylcoumarine, bepaald met behulp van de MTT-test (uitgevoerd zoals beschreven in Hoofdstuk VI.3.2.) op de Caco-2T cellijn, vertoont ook deze ligand een lage cytotoxische activiteit ($\text{IC}_{50} = 788.28 \pm 190.25 \mu\text{M}$).



VI.4.1.4. Cytotoxiciteit van cis-dichloor-di(7-amino-4-trifluormethylcoumarine)-platina (II) CDATP

De dosis-responscurve voor CDATP in de cellijnen Caco-2T, SKBR-3 en OVCAR-3 is weergegeven in figuur 6.9. De IC_{50} waarde bekomen voor de cellijnen Caco-2T en OVCAR-3 is gelijkwaardig en bedraagt $16.95 \pm 11.17 \mu M$. De SKBR-3 cellijn blijkt minder gevoelig te zijn voor deze component wat weerspiegeld wordt in zijn ietwat hogere IC_{50} waarde 50.09 ± 4.63 . De cytotoxiciteit van CDATP is dus vergelijkbaar met de activiteit van CDDP.

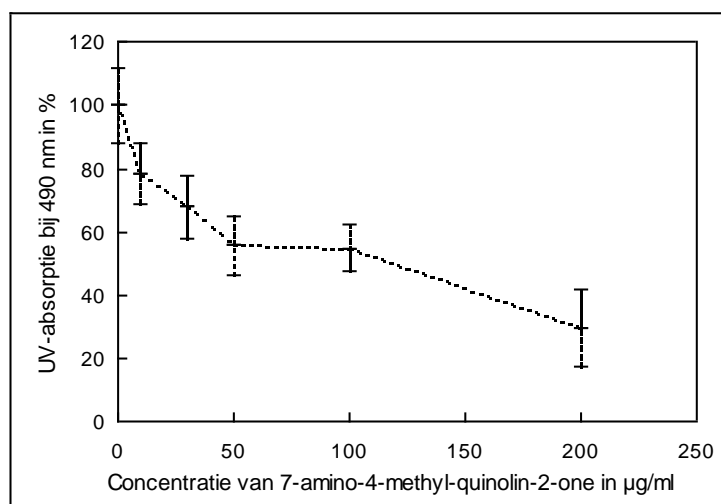
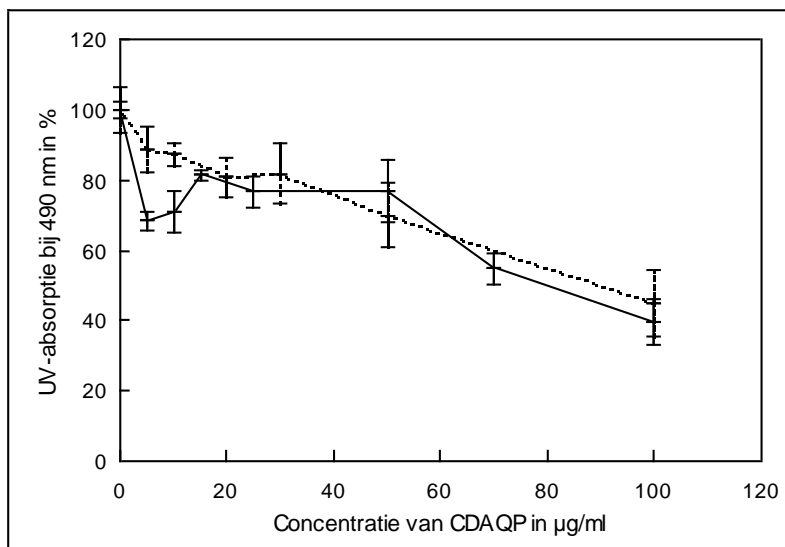
Het aminocoumarineligand van deze component, 7-amino-4-trifluormethylcoumarine, bleek geen cytotoxische activiteit te vertonen over het onderzochte dosagegebied van 0 tot 200 µg/ml.



VI.4.1.5. Cytotoxiciteit van
cis-dichloor-di(7-amino-4-methyl-quinolin-2-one)-platina (II) CDAQP

De IC_{50} waarde voor de cellijnen Caco-2T en SKBR-3 is, zoals blijkt uit de dosis-responscurve in figuur 6.10, gelijkwaardig en bedraagt $137.27 \pm 23.96 \mu M$. Dit wijst op een geringe cytotoxische activiteit van deze component.

Uit de dosis-responscurve (figuur 6.11) van het aminocoumarineligand van CDAQP, 7-amino-4-methyl-quinolin-2-one, blijkt dit ligand ook een lage cytotoxische activiteit te vertonen ($IC_{50} = 717.60 \pm 187.96 \mu M$).

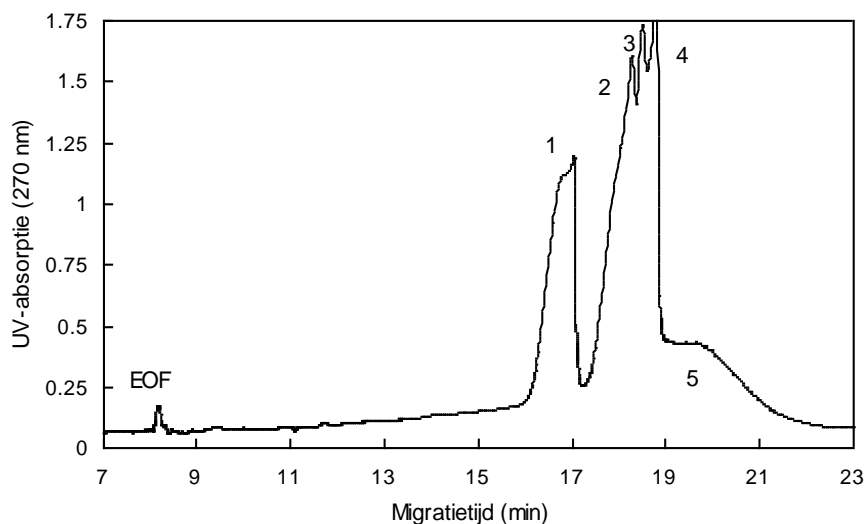


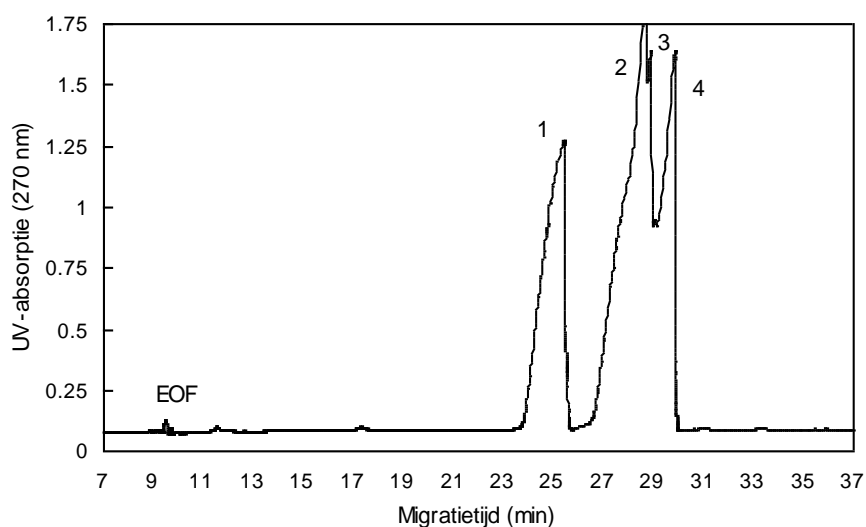
VI.4.2. Onderzoek naar de interactie van de platinaverbindingen met DNA

VI.4.2.1. Analyse met CZE

De DNA-hydrolysaten bekomen na incubatie met de aminocoumarineplatina(II) complexen en CDDP (inputratio 0.05; Hoofdstuk VI.3.3.), evenals een blanco, werden geanalyseerd met behulp van CZE (zoals beschreven in Hoofdstuk VI.3.6.). Daartoe werd een aliquot van de stalen 1 op 2 verdund in HPLC-water. Om voldoende staal te kunnen injecteren werd na een hydrodynamische injectie van 120 mbar gedurende 12 seconden, de “sample stacking”-techniek toegepast zoals beschreven in hoofdstuk II van dit proefschrift.

Het elektroferogram (figuur 6.12), bekomen na analyse van het DNA-hydrolysaat van het reactiemengsel van CDAP, vertoonde een diffuse piek die gedeeltelijk samen migreert met en na de 5'-mononucleotiden aanwezig in het DNA-hydrolysaat. Deze diffuse piek was niet aanwezig in het DNA-hydrolysaat van blanco DNA (figuur 6.13).





Deze diffuse piek was eveneens afwezig in het DNA-hydrolysaat van het reactiemengsel met

CDDP (inputratio 0.05). De diffuse piek was pas detecteerbaar in het CDDP-reactiemengsel vanaf een inputratio van 0.1, dit is in overeenstemming met de experimenten uitgevoerd door Eastman (1986), die 14% van het gebonden platina toewees als gecomplexeerd aan onvolledig gehydrolyseerd DNA bij een inputratio van 0.1.

In tabel 6.4 is voor de verschillende aminocoumarineplatina(II) complexen de verhouding tussen de piekoppervlaktes van de diffuse piek tot de 5'-mononucleotidepieken procentueel weergegeven samen met hun overeenkomstige IC_{50} -waarden. Uit deze gegevens blijkt er een verband te bestaan tussen de intensiteit van deze diffuse piek en de cytotoxiciteit van de component. CDAAP dat geen cytotoxiciteit vertoonde blijkt ook geen diffuse piek te vertonen in zijn elektroferogram. Gezien het gelijkaardig elektroforetisch gedrag van deze diffuse piek met hoogmoleculairgewicht DNA en de observaties van Eastman (1986) kunnen we aannemen dat deze diffuse piek een verzameling is van oligonucleotiden van verschillende lengte en sequentie die door de aanwezigheid van platina-adducten niet volledig gehydrolyseerd worden door het nuclease P_1 enzyme.

Tabel 6.4: Verhouding van de piekoppervlaktes van de diffuse piek tot de 5'-mononucleotidepieken in relatie tot de cytotoxiciteit van de desbetreffende component.

Component	IC ₅₀ waarde in μM (± SD)	verhouding van de piekoppervlakte van de diffuse piek tot de 5'-mononucleotidepiek in % (± SD)
CDAP	9.48 ± 2.86	34.96 ± 9.52
CDAAP	-	0
CDAMP	162.24 ± 76.75	4.47 ± 2.25
CDATP	16.95 ± 11.17	10.50 ± 3.15
CDAQP	137.27 ± 23.96	2.76 ± 1.35

Langere incubatietijden, tot 24 uur, voor de DNA-hydrolyse met nuclease P₁ of toevoegen van extra nuclease P₁, tot 20 U, had geen effect op de hydrolyse van deze diffuse piek. Ook toepassing van het SVP-protocol kon deze diffuse piek niet verder hydrolyseren. Het feit dat deze DNA-complexen zo resistent blijken tegen hydrolyse met beide enzymen wijst erop dat deze wijzigingen ook voor andere enzymen een onoverkomelijk probleem vormen, zoals het DNA-polymerase en RNA-polymerase. De aanwezigheid van dergelijke adducten kan dan ook een verklaring vormen voor de cytotoxische activiteit van deze componenten.

VI.4.2.2. Bepaling van de efficiëntie van de DNA-CDAP complexvorming

Van het reactiemengsel van CDAP met DNA werden eveneens de

chloroform-fracties die gebruikt werden om na de incubatie DMSO te verwijderen, het ethanolisch supernatans bekomen na DNA-precipitatie, de stockoplossing van CDAP (1mg/ml) en het DNA-hydrolysaat geanalyseerd op ZAAS (zie Hoofdstuk VI.3.8.). Op die manier werd bepaald hoeveel van het toegevoegde platina uiteindelijk complexeerd aan DNA, en dus aanwezig is in het DNA-hydrolysaat, en hoeveel er niet-gecomplexerd was aan DNA en dus aanwezig is in de chloroformfase en het ethanolisch supernatans. De resultaten van deze metingen zijn weergegeven in tabel 6.5. Het percentage van het toegevoegde platina werd berekend ten opzichte van de totale hoeveelheid platina die oorspronkelijk werd toegevoegd in de reactie. Deze werd bepaald op $28.27 \pm 1.8 \mu\text{g}$ via analyse van de stockoplossing met ZAAS.

Tabel 6.5: Bepaling van de hoeveelheid platina gecomplexerd aan DNA na chloroformextractie en ethanolprecipitatie met ZAAS.

	Hoeveelheid platina (in $\mu\text{g} \pm \text{SD}$) in de volledige fractie	% van het toegevoegde platina $\pm \text{SD}$
chloroform fractie	0.899 ± 0.05	3.18 ± 0.2
ethanolisch supernatans	1.055 ± 0.05	3.71 ± 0.2
DNA-hydrolysaat	27.63 ± 1.80	90.84 ± 5.0

Uit deze gegevens blijkt dat het overgrote deel van het platina terug te vinden is in het DNA-hydrolysaat. Het hier bepaalde platina moet dus gebonden zijn aan het DNA om samen met dit DNA te precipiteren tijdens de ethanolprecipitatie. Rekening houdende met het feit dat bij de ethanol precipitatie altijd een restant DNA achterblijft in het ethanolisch supernatans (zo'n 3 à 5%), zal hoogstwaarschijnlijk een gedeelte van het platina dat teruggevonden wordt in het supernatans ook

gecomplexeerd zijn aan DNA. Voortbouwende op deze gegevens kunnen we stellen dat de reactie van CDAP nagenoeg volledig is na 48 uur incubatie.

VI.4.2.3. Preparatieve CZE gecombineerd met ZAAS

Om na te gaan of inderdaad de complexvorming tussen platina en DNA verantwoordelijk is voor de inhibitie van de DNA-hydrolyse werd de diffuse piek gecollecteerd door middel van preparatieve CZE (zie Hoofdstuk VI.3.7.). Daartoe werd het DNA-hydrolysaat van het reactiemengsel met CDAP, evenals een blanco, onderworpen aan de preparatieve CZE-scheiding. Het elektroferogram van deze scheidingen is weergegeven in de figuren 6.12 en 6.13. De fractiecollectie werd gestart na 27 minuten elektroforese, waardoor alles met een migratietijd groter dan 19 minuten in het elektroferogram, zijnde de diffuse piek, gecollecteerd wordt (zoals berekend met formule 15). Met de hier beschreven procedure kon de piek gecollecteerd worden in een buffervolume van 10 μ l zonder dat de elektroforese onderbroken diende te worden. Dit volume werd vervolgens manueel in de grafietoven van het ZAAS-systeem (zie Hoofdstuk VI.3.8.) gepipetteerd teneinde het platinagehalte van de verzamelde fractie te bepalen. In tabel 6.6 zijn de resultaten van deze experimenten weergegeven. Gebruikmakend van de formule 13 en van de bepaalde hoeveelheid platina aanwezig in het DNA-hydrolysaat (zie tabel 6.5) werd berekend hoeveel platina er op het capillair geïnjecteerd werd.

Tabel 6.6: Resultaten van de bepaling van de hoeveelheid platina aanwezig in de diffuse piek na preparatieve CZE-ZAAS-analyse.

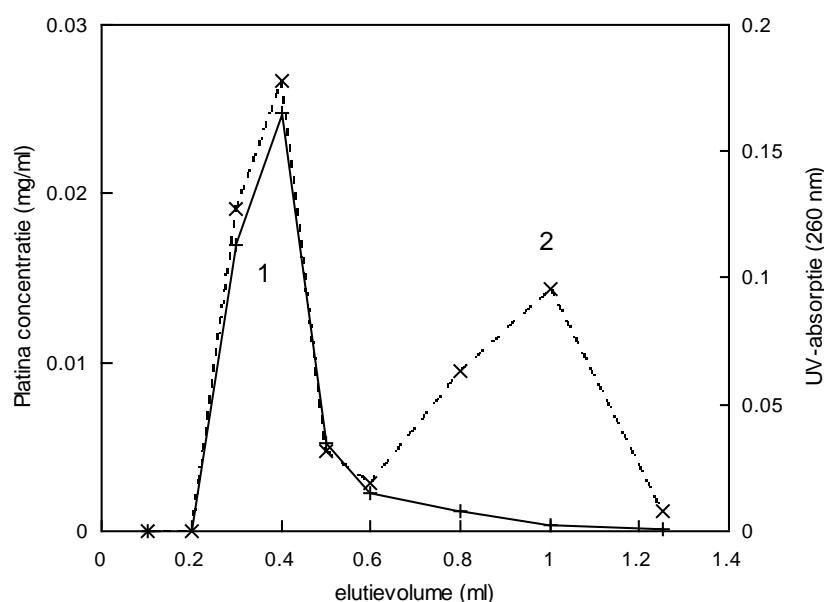
	Hoeveelheid platina aanwezig in de gecollecteerde fractie bepaald met ZAAS (in ng \pm SD)	Berekening van de hoeveelheid platina geïnjecteerd op het capillair
DNA-CDAP staal	8.88 \pm 0.5	8.44
blanco DNA staal	-0.07 \pm 0.5	0

Hieruit blijkt dat alle platina dat op het capillair geïnjecteerd werd, aanwezig is in de gecollecteerde fractie. Dit bewijst dat preparatieve CZE mogelijk is op de hier beschreven wijze. De hoeveelheid platina aanwezig in de gecollecteerde fractie was 17.6 keer groter dan de hoeveelheid platina aanwezig in de laagste platina standaard (0.5 ng), wat betekent dat de hoeveelheden die geïnjecteerd worden bij CZE ruim voldoende zijn om te verzamelen en te analyseren op ZAAS.

Bovendien blijkt uit deze experimenten dat alle platina aanwezig in het DNA-hydrolysaat terug te vinden is in de diffuse piek wat de conclusie sterkt dat platina gecomplexeerd op het DNA verantwoordelijk is voor de inhibitie van de enzymatische hydrolyse van dit DNA.

VI.4.2.4. Analyse met ZAAS na gelfiltratie

Het DNA-hydrolysaat van het reactiemengsel met CDAP, evenals een blanco werden gescheiden op Sephadex G-25 M kolommen (zie Hoofdstuk VI.3.4.). Deze kolommen bezitten een moleculairgewichtsexclusielimiet van 5000 Da. Deze experimenten werden uitgevoerd om te bevestigen dat er inderdaad hoogmoleculairgewicht DNA (oligonucleotiden) aanwezig was in het DNA-hydrolysaat. Zoals blijkt uit de UV-absorptie weergegeven in figuur 6.14 is een groot gedeelte van het DNA-hydrolysaat na reactie met CDAP aanwezig in de hoogmoleculairgewichtsfractie (elutievolume lager dan 0.6 ml).



In het DNA-hydrolysaat van ongereageerd kalfthymus DNA werd geen hoogmoleculairgewicht DNA teruggevonden. Dit wijst erop dat inderdaad de complexvorming tussen CDAP en DNA verantwoordelijk is voor een inhibitie van de enzymatische hydrolyse van dit DNA wat aanleiding geeft tot de aanwezigheid van oligonucleotiden. Vervolgens werd met behulp van het ZAAS-systeem de platinaconcentratie in deze fracties bepaald (zie Hoofdstuk VI.3.8.). Zoals blijkt uit figuur 6.14 werd alle platina teruggevonden in de fracties die ook het

hoogmoleculairgewicht DNA bevatten. Deze gegevens bevestigen dat inderdaad de platinering van het DNA zorgt voor een inhibitie van de DNA-hydrolyse. Vervolgens werden de verzamelde fracties geanalyseerd met behulp van CZE (zie Hoofdstuk VI.3.6). Analyse van de hoogmoleculairgewichtsfractie (elutievolume 0.4 ml) op CZE resulteert in een diffuse piek in het elektroferogram (figuur 6.15), wat nogmaals de hypothese bevestigt dat de diffuse piek inderdaad een verzameling is van oligonucleotiden waaraan platina gecomplexeerd is. Uit analyse van de laagmoleculairgewichtsfractie (elutievolume 1.0 ml) blijkt dat dit inderdaad de ongemodificeerde 5'-mononucleotiden zijn (figuur 6.16). De TMP-piek ontbreekt in dit elektroferogram daar TMP volledig elueert in de fractie gecollecteerd bij 0.8 ml.

VI.4.2.5. CZE-analyse na deplatineren met thioureum

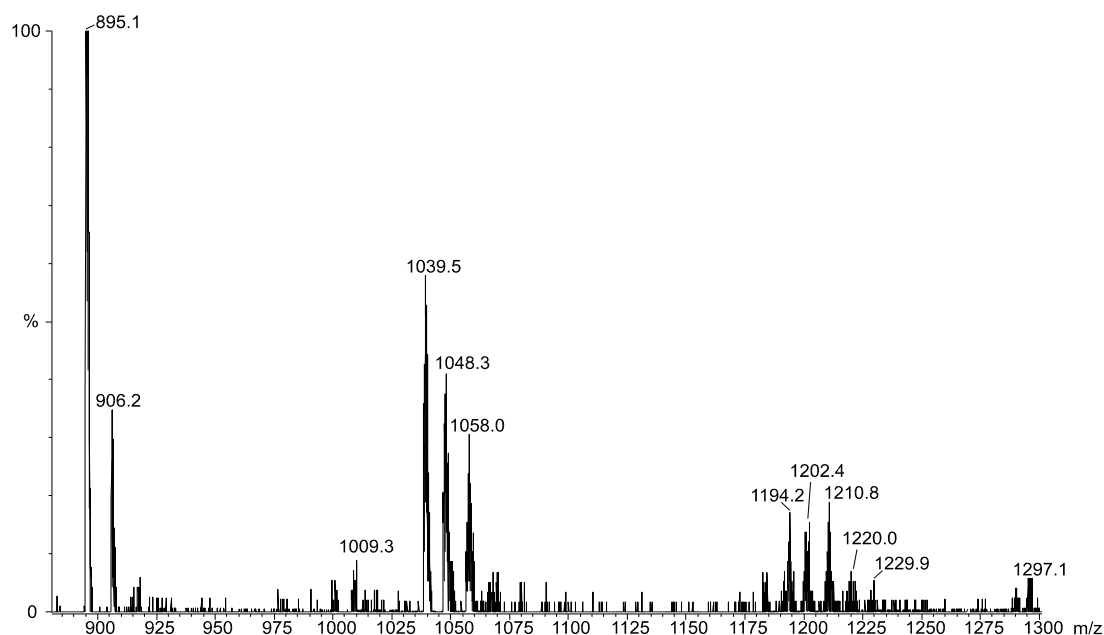
CZE-analyse (zie Hoofdstuk VI.3.6.) van het staal na incubatie met thioureum (zie Hoofdstuk VI.3.5.) dat werd opgekookt teneinde de enzymatische activiteit van de DNA-hydrolyserende enzymen teniet te doen leert ons dat de diffuse piek behouden blijft (figuur 6.17) ook na verwijderen van het complexerende platina. Wanneer het elektroferogram bestudeerd wordt van het staal dat niet werd opgekookt bekomen na incubatie met thioureum (figuur 6.18) blijkt dat hier de hydrolyse is doorgegaan en dat de vier 5'-mononucleotiden worden bekomen. Dit kan als volgt verklaard worden: wanneer de oligonucleotiden vrijgesteld worden uit hun platinacomplex komen ze opnieuw beschikbaar voor het nuclease P_1 dat hier nog aanwezig is en worden deze oligonucleotiden gehydrolyseerd tot hun 5'-mononucleotiden. Opmerkelijk is wel dat het nuclease P_1 enzyme zijn activiteit blijft behouden in de aanwezigheid van 1 M thioureum. Samen met de voorgaande resultaten vormen deze beide experimenten voldoende bewijs om aan te nemen dat de diffuse piek inderdaad oligonucleotiden zijn die gecomplexeerd zijn met platina waardoor de enzymatische hydrolyse wordt geïnhibeerd.

Tevens wordt hiermee bewezen dat deze platinacomplexen met oligonucleotiden de voornaamste reactieproducten zijn van CDAP en DNA. Het bleek echter onmogelijk om deze oligonucleotidecomplexen met behulp van CZE-ES-MS te identificeren, dit is waarschijnlijk te wijten aan de veelheid van verschillende oligonucleotiden aanwezig in de diffuse piek.

VI.4.2.6. Analyse met CZE-ES-QTOF

VI.4.2.6.1. Analyse van het reactiemengsel van CDDP met het oligonucleotide.

Het massaspectrum bekomen na analyse met behulp van CZE-ES-QTOF (zoals beschreven in Hoofdstuk VI.3.9.1.) van het reactiemengsel van het synthetisch hexameer oligonucleotide pApGpGpCpCpT met CDDP (zie Hoofdstuk VI.3.9.) is weergegeven in figuur 6.19.



De producten teruggevonden in dit massaspectrum werden op basis van hun m/z waarden tentatief gekarakteriseerd (zie tabel 6.7). Met uitzondering van het product bij m/z 1297.1 dat driemaal negatief geladen is zijn alle producten tweemaal negatief geladen.

TABEL 6.7: Tentatieve karakterisering van de producten aanwezig in het reactiemengsel van het hexameer oligonucleotide en CDDP.

m/z	lading	MG	tentatieve karakterisering
895.1	-2	1792.2	Oligonucleotide pApGpGpCpCpT (oligo)
906.2	-2	1814.4	natrium adduct van het oligonucleotide
1009.3	-2	2020.6	Oligo+Pt+2(NH ₃)
1039.5	-2	2081.0	Oligo+Pt+DMSO+NH ₃
1048.3	-2	2098.6	Oligo+Pt+DMSO+2(NH ₃)
1058.0	-2	2118.0	Oligo+Pt+DMSO+Cl+NH ₃

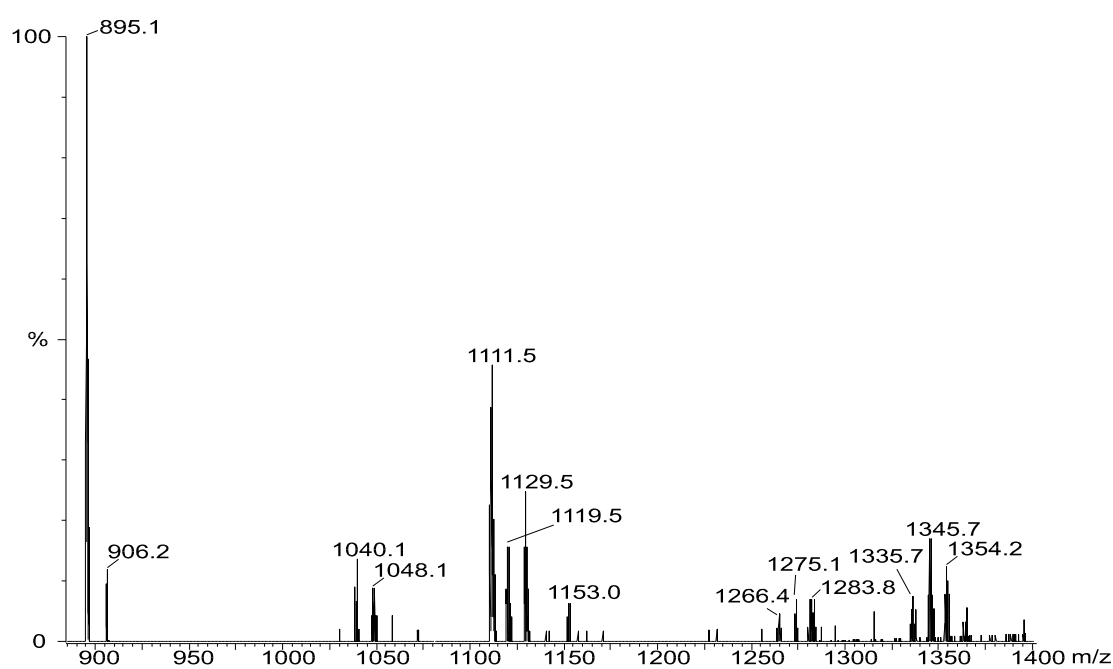
1194.2	-2	2390.4	Oligo+2Pt+2DMSO+Cl+NH ₃
1202.4	-2	2406.8	Oligo+2Pt+2DMSO+Cl+2(NH ₃)
1210.8	-2	2423.6	Oligo+2Pt+2DMSO+Cl+3(NH ₃)
1220.0	-2	2442.0	Oligo+2Pt+2DMSO+2Cl+2(NH ₃)
1229.9	-2	2461.8	Oligo+2Pt+2DMSO+3Cl+NH ₃
1297.1	-3	3894.3	2oligo+Pt+DMSO+Cl

Uit deze gegevens blijkt dat CDDP aanleiding geeft tot de vorming van diverse complexen met het synthetische oligonucleotide. Met uitzondering van het adduct bij m/z 1009.3 bevatten alle platinacomplexen minstens één DMSO-ligand. Dit DMSO-ligand was oorspronkelijk niet aanwezig in CDDP en is dus hoogstwaarschijnlijk gevormd door uitwisseling van een chloride- of een ammoniumligand met DMSO aanwezig in de incubatie-oplossing. Naast een aantal monovalente oligonucleotide-platina complexen (bij m/z 1048.3; 1058.0; 1210.8; 1220.0 en 1229.9) zijn ook een aantal divalente adducten aanwezig: bij m/z 1009.3; 1039.5; 1194.2; 1202.4 en 1297.1. Met uitzondering van dit laatste adduct zijn alle divalente adducten intrastrand-adducten, veroorzaakt door tweemaal binden van platina op dezelfde streng. Gezien de in de literatuur beschreven uitgesproken voorkeur van platina om te reageren op de guanine- en de adeninebase (Eastman, 1982) kunnen we aannemen dat ook hier hoofdzakelijk de intrastrand adducten Pt-GG en Pt-AG gevormd worden. Het adduct bij m/z 1297.1 dat driemaal geladen is ontsaat door interstrand-adductvorming van het platina met twee oligonucleotiden. Dit interstrandadduct is slechts in een minimale hoeveelheid aanwezig, wat in overeenstemming is met de literatuurgegevens (Zwelling en Kohn, 1979; Plooy et al., 1984).

Deze gegevens tonen aan dat de hier op punt gestelde CZE-ES-QTOF analysemethodologie geschikt is om de adductvorming van CDDP en oligonucleotiden te bestuderen.

VI.4.2.6.2. Analyse van het reactiemengsel van CDAP met het oligonucleotide.

Het massaspectrum bekomen na analyse met behulp van CZE-ES-QTOF (zoals beschreven in Hoofdstuk VI.3.9.1.) van het reactiemengsel van het synthetisch oligonucleotide met CDAP (zie Hoofdstuk VI.3.9.) is weergegeven in figuur 6.20.



De producten teruggevonden in dit massaspectrum werden op basis van hun m/z waarden tentatief gekarakteriseerd (zie tabel 6.9). Alle producten zijn tweemaal negatief geladen ($[M-2H]^{2-} = m/z$).

TABEL 6.9: Tentatieve karakterisering van de producten aanwezig in het reactiemengsel van het hexameer oligonucleotide en CDAP.

m/z	lading	MG	tentatieve karakterisering
895.1	-2	1792.2	Oligonucleotide pApGpGpCpCpT (oligo)
906.2	-2	1814.4	natrium adduct van het oligonucleotide

1040.1	-2	2082.2	Oligo+Pt+DMSO+H ₂ O
1048.1	-2	2098.2	Oligo+Pt+DMSO+Cl
1111.5	-2	2225.0	Oligo+Pt+aminocoumarine+DMSO
1119.5	-2	2241.0	Oligo+Pt+aminocoumarine+DMSO+H ₂ O
1129.5	-2	2261.0	Oligo+Pt+aminocoumarine+DMSO+Cl
1153.0	-2	2308.0	Oligo+Pt+2aminocoumarine
1266.4	-2	2534.8	Oligo+2Pt+2aminocoumarine+2H ₂ O
1275.1	-2	2552.2	Oligo+2Pt+2aminocoumarine+Cl+H ₂ O
1283.8	-2	2569.6	Oligo+2Pt+2aminocoumarine+2Cl
1335.7	-2	2673.4	Oligo+2Pt+2aminocoumarine+2DMSO+H ₂ O
1345.7	-2	2693.4	Oligo+2Pt+2aminocoumarine+2DMSO+2H ₂ O
1354.2	-2	2710.4	Oligo+2Pt+2aminocoumarine+2DMSO+Cl+H ₂ O

Uit deze gegevens blijkt dat CDAP net als CDDP aanleiding geeft tot de vorming van diverse complexen met het synthetische oligonucleotide. Ook hier bevatten vele adducten één of twee DMSO-liganden. Ook hier is dit DMSO-adduct hoogstwaarschijnlijk gevormd door uitwisseling van een chloride- of een aminocoumarineligand met DMSO aanwezig in de incubatie-oplossing. Naast een aantal monovalente oligonucleotide-platina complexen (bij m/z 1119.5; 1129.5; 1345.7; 1354.2) zijn het merendeel van de adducten divalente platina-oligonucleotide complexen: bij m/z 1040.1; 1048.1; 1111.5; 1153.0; 1266.4; 1275.1; 1283.8; 1335.7. Deze divalente adducten zijn alle intrastrand-adducten, veroorzaakt door tweemaal binden van platina op dezelfde streng. Gezien de in de literatuur beschreven uitgesproken voorkeur van platina om te reageren op de guanine- en de adeninebase (Eastman, 1982) kunnen we aannemen dat ook hier hoofdzakelijk de intrastrand adducten Pt-GG en Pt-AG gevormd worden. In

tegenstelling tot CDDP vormt CDAP geen waarneembare interstrand-adducten.

Dankzij het gebruik van CZE-ES-QTOF hebben we kunnen aantonen dat CDAP op een analoge manier als CDDP interageert met DNA en dat daarbij naast de chloorliganden ook de aminocoumarineliganden uit het platinacomplex verdrongen kunnen worden.

VI.5. Besluit

Met behulp van de MTT-test op de verschillende cellijnen werd de cytotoxiciteit van de aminocoumarineplatina(II) verbindingen bepaald en vergeleken met de cytotoxiciteit van CDDP. Alhoewel gerapporteerd wordt dat de OVCAR-3 cellijn resistent is tegen klinische dosissen van CDDP bleek in onze experimenten geen verschil te bestaan in de gevoeligheid van deze OVCAR-3 cellijn en de SKBR-3 cellijn ten opzichte van CDDP. CDAP en CDATP vertoonden een cytotoxiciteit die vergelijkbaar is met de cytotoxische activiteit van CDDP. Het CDAAP, CDAMP en CDAQP vertoonden slechts een geringe tot geen activiteit.

Uit CZE-analyse, met de in Hoofdstuk II op punt gestelde methode, van de reactiemengsels van de aminocoumarineplatina(II) verbindingen met kalfthymus DNA, bleek er een verband te bestaan tussen de cytotoxiciteit van de componenten en de hoeveelheid onvolledig gehydrolyseerde oligonucleotiden aanwezig in het DNA-hydrolysaat. We kunnen dus aannemen dat de cytotoxische activiteit van deze platinaverbindingen te wijten is aan hun interactie met DNA. Teneinde verder onderzoek te kunnen verrichten naar deze onvolledig gehydrolyseerde oligonucleotiden werd een preparatieve CZE-scheiding ontwikkeld die eenvoudig geïmplementeerd kan worden en die toelaat dat de fracties verzameld kunnen worden zonder de elektroforese stroom te onderbreken. Voor het eerst werd ZAAS uitgevoerd in combinatie met preparatieve CZE (Deforce et al., 1998). Dankzij dit onderzoek konden we aantonen dat adductvorming met platina verantwoordelijk is voor de onvolledige hydrolyse van de platina-gecomplexeerde oligonucleotiden.

Met behulp van de hier ontwikkelde CZE-ES-QTOF-analyse (Deforce et al., 1998b) van het reactiemengsel van een synthetisch oligonucleotide en CDAP werd aangetoond dat CDAP evenals CDDP naast monovalente oligonucleotide-platinacomplexen ook, en dit in grotemate, divalente platina-oligonucleotide complexen vormt.

VI.6. Referenties

- Blommaert FA, van Dijk-Knijnenburg HCM, Dijt FJ, den Engelse L, Baan RA, Berends F and Fichtinger-Schepman AMJ. Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells. *Biochemistry-US*. 1995, 34, 8474-8480.
- Blommaert FA. Detection of platinum-DNA adducts. Proefschrift voorgelegd tot het verkrijgen van de graad van doctor. Universiteit Amsterdam, Nederland, 1996.
- Boogerd W, ten Bokkel Huinck WW, Dalesio O, Hoppenbrouwers WJJF and van der Sande JJ. Cisplatin-induced neuropathy: central, peripheral and autonomic nerve involvement. *J. Neuro-Oncol.* 1990, 9, 255-263.
- Chastre E, Empereur S, Di Gioia Y, el Mahdani N, Mareel M, Vleminckx K, Van Roy F, Bex V, Emami S and Spandidos DA. Neoplastic progression of human and rat intestinal cell lines after transfer of the ras and polyoma middle T oncogenes. *Gastroenterology*. 1993, 105/6, 1776-1789.
- Chiu RW, Walker KL, Hagen JJ, Monning CA and Wilkins CL. Coaxial capillary and conductive capillary interfaces for collection of fractions isolated by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 1995, 67, 4190-4196.
- Cifuentes A, Xu X, Kok WT and Poppe H. Optimum conditions for preparative operation of capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A*. 1995, 716, 141-156.
- Cornelison TL and Reed E. Review: Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin and ormaplatin. *Gynecol. Oncol.* 1993, 50, 147-158.
- Deforce DLD, Kokotos G, Esmans EL, De Leenheer A and Van den Eeckhout EG. Preparative capillary zone electrophoresis in combination with off-line graphite furnace atomic absorption for the analysis of DNA complexes formed by a new aminocoumarine platinum(II) compound. *Electrophoresis*. 1998, 19, 2454-2458.
- Deforce DLD, Raymackers J, Meheus L, Van Wijnendaele F, De Leenheer A and Van den Eeckhout EG. Characterization of DNA oligonucleotides by coupling of capillary zone electrophoresis to electrospray ionization Q-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1998b, 70, 3060-3068.
- Eastman A. Separation and characterization of products resulting from the

reaction of cis-diamminedichloroplatinum(II) with deoxyribonucleosides.
Biochemistry-US. 1982, 21, 6732-6736.

-
- Eastman A. Reevaluation of the interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum (II) with DNA. *Biochemistry-US*. 1986, 25, 3912-3915.
 - Fichtinger-Schepman AMJ, van der Veer JL, den Hartog JHJ, Lohman PHM and Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification and quantitation. *Biochemistry-US*. 1985, 24, 707-713.
 - Filipski J, Kohn KW, Prather R and Bonner WM. Thiourea reverses cross-links and restores biological activity in DNA treated with dichlorodiaminoplatinum (II). *Science*. 1979, 204, 181-183.
 - Gercel-Taylor C, Hoffman JP, Taylor DD, Owens KJ and Eisenberg BL. Interleukin-2 activation of cytotoxic cells in postmastectomy seroma. *J. Surg. Res.* 1996, 61, 89-96.
 - Greig M and Griffey RH. Utility of organic bases for improved electrospray mass spectrometry of oligonucleotides. *Rapid Commun. Mass Sp.* 1995, 9, 97-102.
 - Kokotos G, Theodorou V, Tzougraki C, Deforce D and Van den Eeckhout E. Synthesis and *in-vitro* cytotoxicity of aminocoumarin platinum(II) complexes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 7/17, 2165-2168.
 - Lee HG, Tseng JH, Becklin RR and Desiderio DM. Preparative and analytical capillary zone electrophoresis analysis of native endorphins and enkephalins extracted from the bovine pituitary: Mass spectrometric confirmation of the molecular mass of leucine enkephalin. *Anal. Biochem.* 1995, 229, 188-197.
 - Limbach PA, Crain PF and McCloskey JA. Molecular mass measurement of intact ribonucleic acids via electrospray ionization quadrupole mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1995, 6, 27-39.
 - Maarouf M, de Kouchkovsky Y, Brown S, Petit PX and Robert GM. In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp. Cell Res.* 1997, 232, 339-348.
 - Muddiman DC, Wunschel DS, Liu C, Pasa-Tolic L, Fox KF, Anderson GA and Smith RD. Characterization of PCR products from *Bacilli* using electrospray ionization FTICR mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1996, 68, 3705-3712.
 - Müller O, Foret F and Karger BL. Design of a high-precision fraction collector for capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 1995, 67, 2974-2980.

- Plooy ACM, van Dijk M and Lohman PHM. Induction and repair of DNA cross links in Chinese hamster ovary cells treated with various platinum coordination compounds in relation to platinum binding to DNA, cytotoxicity, mutagenicity, and antitumor activity. *Cancer Res.* 1984, 44, 2043-2051.
- Reedijk J. The mechanism of action of platinum anti-tumor drugs. *Pure Appl. Chem.* 1987, 59, 181-192.
- Reedijk J. Improved understanding in platinum antitumour chemistry. *Chem. Commun.* 1996, 801-806.
- Rekka EA, Soldan M, Belai I, Netter KJ and Maser E. Biotransformation and detoxification of insecticidal metyrapone analogues by carbonyl reduction in the human liver. *Xenobiotica.* 1996, 26, 1221-1229.
- Romijn JC, Verkoelen CF and Schroeder FH. Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro: establishment of test conditions and assessment of hormone-stimulated growth and drug-induced cytostatic and cytotoxic effects. *Prostate.* 1988, 12, 99-110.
- Sai SI, Kumazawa H, Tachikawa T, Yamashita T and Kawamoto K. Alteration of sensitivity to *cis*-diamine(glycolate)-platinum(II) (254-S) in oral tumor xenografts following multiple applications. *Int. J. Oncol.* 1996, 8, 57-63.
- Siler DF, Wheelless CR and Dubin NH. Radiotherapy as a cisplatin-sensitizer in a resistant ovarian carcinoma cell line. *Cancer.* 1996, 77, 1850-1853.
- Walker KL, Chiu RW, Monnig CA and Wilkins CL. Off-line coupling of capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1995, 67, 4197-4204.
- Wang K, Lu J and Li R. The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coordin. Chem. Rev.* 1996, 151, 53-88.
- Wang Z, Lee KB, Reed E and Sinha BK. Sensitization by interleukin-1 alpha of carboplatinum anti-tumor activity against human ovarian (NIH:OVCAR-3) carcinoma cells in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer.* 1996, 68/5, 583-587.
- Weinmann W, Parker CE, Deterding LJ, Papac DI, Hoyes J, Przybylski M and Tomer KB. Capillary electrophoresis-matrix-assisted laser-desorption ionization mass spectrometry of proteins. *J. Chromatogr. A.* 1994, 680, 353-361.
- Zwelling LA and Kohn KW. Mechanism of action of

cisdichlorodiammineplatinum(II). *Cancer Treat. Rev.* 1979, 63, 1439-1443.

SAMENVATTING EN BESLUIT

ONDERZOEK VAN DE DNA-ADDUCTVORMING VAN EPOXIDEN EN PLATINAVERBINDINGEN MET BEHULP VAN CAPILLAIRE ZONE ELEKTROFORESE EN GEKOPPELDE ELEKTROSPRAY MASSASPECTROMETRIE

In de strijd tegen kanker vormt het DNA-adductonderzoek een belangrijke peiler. In het kader van de preventie van kanker is het belangrijk om onderzoek te verrichten naar potentiële carcinogene en/of genotoxische stoffen om zo het risico van het gebruik van deze stoffen adequaat te kunnen inschatten en de nodige voorzorgsmaatregelen te kunnen nemen. Daarbij dient onderzocht te worden wat de interactie is van deze potentiële carcinogene en/of genotoxische stoffen met ons genetisch materiaal. Bovendien dient in het kader van de behandeling van bestaande kankers eveneens onderzoek verricht te worden naar nieuwe chemotherapeutica. Ook in dit onderzoek is het belangrijk om DNA-adductonderzoek te verrichten naar de interactie van deze potentiële chemotherapeutica met DNA teneinde een beter inzicht te verkrijgen in de werking van deze stoffen.

In dit proefschrift werd onderzoek verricht naar de DNA-adductvorming van PGE als een modelcomponent voor de groep van de epoxiden, teneinde meer argumenten te kunnen aanvoeren omtrent de cytotoxiciteit en/of mogelijke genotoxiciteit van PGE en andere epoxiden. Er werd eveneens onderzoek uitgevoerd naar een nieuwe groep platinaverbindingen. Dit onderzoek kaderde in de zoektocht naar nieuwe chemotherapeutica in de strijd tegen kanker.

In het DNA-adductonderzoek is het belangrijk om de structuur van de eventueel gevormde DNA-adducten te bepalen teneinde het werkingsmechanisme dat de DNA-schade veroorzaakt te kunnen achterhalen. Zo kunnen de gevolgen van een eventuele blootstelling aan bepaalde stoffen correct ingeschat worden. In dit opzicht dienen analysemethodologieën ontwikkeld te worden die met een voldoende gevoeligheid structuuridentificatie van de DNA-adducten mogelijk maakt.

De hoofddoelstelling van dit proefschrift was dan ook het ontwikkelen van een analysemethodologie die voldeed aan die eisen gebaseerd op de koppeling van CZE aan

ES-MS.

In hoofdstuk II werd een CZE-analyse op punt gesteld voor de analyse van de DNA-adducten van PGE. Daartoe werd een enzymatische DNA-hydrolyse uitgevoerd met het DNAaseI en het nuclease P₁ enzyme. CZE werd uitgevoerd in een ongewijzigd “fused silica” capillair en detectie werd uitgevoerd met een UV-detector (270 nm). Als buffersysteem werd een vluchtige ammoniumcarbonaatbuffer geselecteerd. Een bufferconcentratie van 100 mM bleek aanleiding te geven tot de beste resolutie en scheidingsefficiëntie. De aangelegde spanning bleek geen noemenswaardige invloed te hebben op de efficiëntie noch op de resolutie van de scheiding en er werd geopteerd voor een elektroforesespanning van 17 kV. De pH van de buffer werd geoptimaliseerd bij 9.68. De detectielimiet van het systeem werd bepaald op 2.9×10^{-5} M.

Teneinde meer staal op het capillair te kunnen injecteren werd een “sample stacking”-techniek ontwikkeld. Deze “sample stacking” laat toe dat een grote hoeveelheid staal op het capillair geladen wordt. Vervolgens worden de negatieve ionen op het capillair geconcentreerd terwijl de staaloplossing uit het capillair wordt verwijderd. Gebruik makende van deze “sample stacking”-techniek werd een detectielimiet van 2.9×10^{-7} M bereikt, wat een verbetering is met een factor 100 ten opzichte van de normale injectie en dit zonder verlies aan resolutie of scheidingsefficiëntie. Een SPE-opzuivering werd ontwikkeld om de DNA-adducten aanwezig in het DNA-hydrolysaat op te zuiveren voor de CZE-analyse. Zodoende konden de ongewijzigde nucleotiden en de zouten aanwezig in het DNA-hydrolysaat volledig verwijderd worden met een efficiëntere “sample stacking” tot gevolg.

De reproduceerbaarheid van de migratietijden kon dankzij het hier ontwikkelde vloeistofnivelleringsysteem sterk verbeterd worden. Zonder dit systeem werd een relatieve procentuele fout van 2.5% bekomen op de migratietijden. Met het systeem kon die teruggebracht worden tot minder dan 1%.

De hier ontwikkelde CZE-analysemethodologie is geschikt voor DNA-adductonderzoek zowel *in vitro* als *in vivo*.

In het derde hoofdstuk werd een *on-line* koppeling tussen CZE en MS op punt gesteld met het gebruik van ES-ionisatie. Hiertoe werd een triaxiale CZE-probe gebruikt waarbij coaxiaal een

“sheath”-vloeistof wordt toegevoegd aan het capillairuiteinde om het ES-proces te bevorderen. Een optimale gevoeligheid werd bereikt bij het gebruik van 80/20 isopropanol/2.5 mM ammoniumcarbonaat als “sheath”-vloeistof. Tijdens de staalinjectie op het CZE-capillair bleek het noodzakelijk om de ES-spanningen in de bron af te zetten om discriminatie van de negatieve ionen tijdens de injectie te voorkomen.

Bij de aanvang van dit doctoraatsonderzoek was de geringe hoeveelheid staal die bij CZE op het capillair wordt geïnjecteerd één van de belangrijkste problemen bij het *on-line* koppelen van CZE-ES-MS. Wij waren dan ook de eerste om de “sample stacking”-procedure compatibel te maken met de *on-line* ES-MS koppeling. Dit betekende een belangrijke doorbraak voor de koppeling van CZE aan ES-MS. Bij het gebruik van het triple quadrupool toestel werd een detectielimiet van 7.25×10^{-7} M bekomen na normale injectie voor detectie in de SIM-modus. Wanneer de hier ontwikkelde “sample stacking” werd gebruikt kon de detectielimiet teruggebracht worden tot 3.63×10^{-9} M voor detectie in de SIM-modus. Dit is een winst in gevoeligheid met een factor 200. Een dergelijke detectielimiet maakt de CZE-ES-MS-techniek geschikt voor *in-vivo* DNA-adductonderzoek. Gebruik makende van het recente QTOF-toestel in combinatie met CZE-ES werden gelijkwaardige detectielimieten bekomen, met dit verschil dat hier met een zelfde gevoeligheid volledige massaspectra werden opgenomen.

Met behulp van de hier op punt gestelde CZE en CZE-ES-MS-analysemethode werd in hoofdstuk IV de adductvorming van PGE met de vier 5'-monofosfaatnucleotiden bestudeerd. Deze nucleotiden werden geselecteerd als modelcomponenten voor de studie van de adductvorming van PGE met DNA. Tevens werden de laag energetische CID-productionenspectra, van de adducten gevormd na interactie van PGE met de nucleotiden, opgenomen met behulp van CZE-ES-MS/MS. Deze productionenspectra lieten de identificatie van de adducten toe en zijn belangrijk als referentie voor de identificatie van de adducten aanwezig in de DNA-hydrolysaten.

In het reactiemengsel van dAMP en PGE werden de volgende belangrijke adducten teruggevonden: di-adduct van dAMP met PGE, met één alkylatie op de fosfaatgroep en één alkylatie op de basegroep en verder een fosfaatgealkyleerd dAMP-PGE-adduct en een

basegealkyleerd dAMP-PGE-adduct. Er werden eveneens een aantal solvolyseproducten geïdentificeerd.

Bij dGMP werden twee di-adducten geïdentificeerd: een eerste met een alkylatie zowel op de fosfaat- als op de basegroep en een tweede met beide alkyleringen op de basegroep. Daarnaast werden een fosfaatgealkyleerd dGMP-PGE-adduct, een basegealkyleerd dGMP-PGE-adduct en een imidazool-ring geopend adduct teruggevonden evenals een aantal solvolyseproducten die gevormd werden door depurinatiereacties.

Na de reactie van dCMP met PGE werden de volgende adducten geïdentificeerd: di-adduct van dCMP met PGE, met één alkylatie op de fosfaatgroep en één alkylatie op de basegroep; een fosfaatgealkyleerd dCMP-PGE-adduct, een basegealkyleerd dCMP-PGE-adduct en één basegealkyleerd dUMP-PGE-adduct. Dit laatste adduct wordt door een hydrolytische deaminatiereactie gevormd uit het basegealkyleerde dCMP-PGE-adduct.

In het reactiemengsel van TMP met PGE werden enkel fosfaatgealkyleerde adducten teruggevonden: één di-adduct en één mono-adduct.

Deze experimenten tonen aan dat CZE-ES-MS en CZE-ES-MS/MS zeer geschikt zijn voor het gebruik in het DNA-adductonderzoek. Dankzij de hier ontwikkelde “sample stacking”-techniek kon voldoende staal geïnjecteerd worden om CID-productionenspectra te kunnen opnemen en zodoende de adducten te identificeren.

In hoofdstuk V werd de DNA-adductvorming van PGE met kalfthymus DNA bestudeerd met behulp van de CZE- en CZE-ES-MS-analysemethodologie. Analyse op agarosegel toonde aan dat PGE verantwoordelijk is voor een afbraak van de integriteit van de DNA-streng. Na 10 uur incubatie met PGE was alle hoogmoleculairgewicht DNA verdwenen. Analyse met CZE van het DNA-supernatans, bekomen na DNA-precipitatie, na incubatie met PGE toonde aan dat gedurende de eerste tien incubatie-uren een groot aantal producten gevormd werden die aanwezig waren in dit supernatans. Pas na tien uur werden ook adducten teruggevonden in de enzymatische DNA-hydrolysaten van de DNA-pellets bekomen na DNA-precipitatie. Dit wijst erop dat deze laatste adducten, die hoofdzakelijk basegealkyleerd zijn, pas gevormd worden nadat de DNA-streng sterk afgebroken is.

Met behulp van CZE-ES-MS/MS werden de CID-productionenspectra van de teruggevonden

adducten bepaald. In het DNA-supernatans werden een hele reeks PGE-gealkyleerde fosfaten teruggevonden. De aanwezigheid van deze adducten toont aan dat fosfotriëster vorming en daaropvolgende hydrolyse verantwoordelijk is voor het verlies van de integriteit van de DNA-streng. We kunnen dan ook besluiten dat fosfaataalkylering de adductvorming is die verantwoordelijk is voor de biologische effecten van PGE. Het breken van de DNA-streng laat vermoeden dat PGE in de eerste plaats een cytotoxische activiteit zal vertonen en slechts gering mutageen en carcinogeen zal zijn wat in overeenstemming is met de waargenomen biologische effecten van PGE (zie hoofdstuk I). Wij waren de eerste om de vorming van fosfaataalkyleringen door PGE aan te tonen evenals de daaropvolgende DNA-hydrolyse. Het hier blootgelegde reactiemechanisme is hoogstwaarschijnlijk ook van toepassing op andere epoxiden en kan belangrijk zijn om de cytotoxiciteit en/of carcinogeniteit van deze producten volledig te begrijpen.

In het laatste hoofdstuk werd onderzoek verricht naar vijf nieuwe platinaverbindingen. Dit onderzoek kaderde in de de speurtocht naar nieuwe potentiële chemotherapeutica. Twee van deze platinaverbindingen, CDAP en CDATP, vertoonden een cytotoxische activiteit die vergelijkbaar was met die van CDDP. De cytotoxiciteit van deze componenten werd bepaald met behulp van de MTT-test. Uit CZE-analyse van de reactiemengsels van deze platinaverbindingen met kalfthymus DNA bleek er een verband te bestaan tussen de hoeveelheid onvolledig gehydrolyseerde oligonucleotiden aanwezig in het DNA-hydrolysaat en de cytotoxiciteit van de componenten. Hieruit kunnen we besluiten dat de cytotoxische activiteit van deze componenten te wijten is aan hun interactie met het DNA. Teneinde deze onvolledig gehydrolyseerde oligonucleotiden verder te kunnen onderzoeken werd een preparatieve CZE-scheiding op punt gesteld waarmee fracties verzameld konden worden zonder onderbreking van de elektroforesestroom. Voor het eerst werd ZAAS uitgevoerd in combinatie met CZE. Dit onderzoek toonde aan dat adductvorming met platina verantwoordelijk is voor de onvolledige hydrolyse van de platina-gecomplexeerde oligonucleotiden. Analyse met het hier ontwikkelde CZE-ES-QTOF-systeem toonde aan dat CDAP in grote mate aanleiding geeft tot divalent gebonden platina-oligonucleotide complexen.

SUMMARY AND CONCLUSION

STUDY OF THE DNA-ADDUCTS OF EPOXIDE AND PLATINUM COMPOUNDS WITH CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS AND ON-LINE COUPLING WITH ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETRY

DNA-adduct research is important in the battle against cancer. In view of the prevention of cancer it is of utmost importance to perform research on potential carcinogenic and/or genotoxic chemicals in order to obtain a rational risk assessment and to evaluate which precautions should be taken when using these compounds. Therefore the interaction of these potential carcinogenic and/or genotoxic compounds with our genetic material has to be investigated. In addition to the prevention of cancer, research has to be performed towards the development of new chemotherapeutics which can be used in the treatment of this disease. In order to gain more knowledge on the reaction mechanisms of chemotherapeutics with DNA it is important to study their DNA-adduct formation.

In this work research was performed to elucidate the DNA-adducts formed by reaction of DNA with phenyl glycidyl ether (PGE). PGE was selected as lead compound to gain more insight in the cytotoxic and/or possible genotoxicity of PGE and other epoxides. Research has also been performed towards a new group of platinum compounds (aminocoumarinplatinum-(II) compounds). These investigations were carried out in the search for new chemotherapeutics to battle cancer.

It is of utmost importance to be able to elucidate the structure of DNA-adducts, since this information is necessary to understand the reaction mechanisms responsible for the observed DNA-damage. With this knowledge a scientifically founded risk related to occupational exposure can be assessed. In order to achieve this goal analytic methodologies have to be developed which can, with sufficient sensitivity, give structural information of these DNA-adducts.

The primary goal of this thesis was to develop such an analytic methodology based on the

on-line coupling of CZE with ES-MS.

In chapter II a CZE-separation was developed for the analysis of the DNA-adducts of PGE. Therefore an enzymatic DNA-hydrolysis was performed using the DNAaseI and nuclease P₁ enzyme. CZE was conducted in an unmodified “fused silica” capillary and detection was done with a UV-detector (270 nm). Ammonium carbonate was selected as a volatile buffersystem. The resolution and separation efficiency were obtained at a buffer concentration of 100 mM. The applied electrophoretic voltage had no appreciable effect on the resolution nor on the efficiency of the separation. An electrophoretic potential of 17 kV was applied for all separations. The pH-value of the buffer was optimized at 9.68. The detection limit was 2.9×10^{-5} M.

In order to be able to inject more sample on the capillary a “sample stacking” technique was developed. Using this “sample stacking” large amounts of sample could be loaded on the capillary. Subsequently the negative sample ions are being concentrated on the capillary while the sample solution is backed out of the capillary. Using this “sample stacking” technique a detection limit of 2.9×10^{-7} M was obtained. This is a 100-fold enhancement in sensitivity compared to normal, conventional, injection and this without loss of resolution or separation efficiency. A solid-phase extraction (SPE) was developed to concentrate the DNA-adducts present in the DNA-hydrolysate prior to analysis by CZE. Using this SPE-procedure the unmodified nucleotides and electrolytes present in the DNA-hydrolysate could be completely removed thus improving the “sample stacking” technique.

The reproducibility of the migration times could be enhanced using the liquid leveling system developed here. Without this system the relative percentual error on the migration times was 2.5%. Using the liquid leveling system this error could be reduced to less than 1%.

The CZE-analysis developed during this work is amenable to DNA-adduct research both *in vitro* and *in vivo*.

In the third chapter an *on-line* coupling between CZE and MS was established using an electrospray (ES) interface. This was accomplished using a triaxial CZE-probe. Using this probe a coaxial sheath liquid was delivered at the capillary exit to enhance the ES-process. Optimal sensitivity was accomplished using 80/20 isopropanol/2.5 mM Ammonium carbonate

as sheath liquid. In order to avoid discrimination of negative ions during injection it was necessary to turn off the ES-potentials in the source during sample injection.

When this work was started one of the major difficulties in the *on-line* coupling of CZE to ES-MS was the minute amount of sample which could be injected on the CZE capillary which led to sensitivity problems for the MS-detection. We were the first to report the use of the “sample stacking” technique in an *on-line* CZE-ES-MS combination. This was a major breakthrough for the use of CZE-ES-MS. Using the triple-quadrupole mass spectrometer in the SIM-mode a detection limit of 7.25×10^{-7} M was obtained using conventional sample injection. Using the “sample stacking” technique the detection limit in the SIM-mode could be reduced to 3.63×10^{-9} M. This constitutes a 200-fold gain in sensitivity. With such detection limits CZE-ES-MS is suited for *in-vivo* DNA-adduct research. Using the recent QTOF-technology combined to CZE similar detection limits were achieved, however using the QTOF a full mass spectrum was recorded with the same sensitivity as the SIM-mode on a triple-quadrupole instrument.

Using the developed CZE and CZE-ES-MS-analysis the adducts formed between PGE and the four 5'-monophosphate nucleotides was studied in chapter IV. These nucleotides were selected as lead components for the study of the adduct formation between PGE and Calf thymus DNA. Using CZE-ES-MS/MS low energetic CID-productionspectra were recorded of the adducts formed between PGE and the nucleotides. These productionspectra allowed the structural identification of the adducts and are useful as reference for the identification of the adducts present in the DNA-hydrolysates.

Upon reaction of dAMP with PGE the following important adducts were found: a di-adduct of dAMP with PGE, bearing one alkyl group on the phosphate moiety and one on the base moiety; a phosphate alkylated dAMP-PGE adduct and a base alkylated dAMP-PGE adduct. In addition some products resulting from solvolysis were identified.

dGMP gave rise to two di-adducts: a first di-adduct alkylated both on the phosphate and the base moiety and a second di-adduct with both alkyl groups on the base moiety. Besides these di-adducts the following compounds were identified: a phosphate alkylated dGMP-PGE adduct, a base alkylated dGMP-PGE adduct and an imidazole-ring opened adduct. Also some

solvolysis products were found probably resulting from depurination reactions.

In the reaction mixture of dCMP with PGE the following adducts could be identified: a di-adduct of dCMP with PGE, bearing one alkyl group on the phosphate moiety and one alkyl group on the base moiety; a phosphate alkylated dCMP-PGE adduct; a base alkylated dCMP-PGE adduct and a base alkylated dUMP-PGE adduct. The latter adduct was formed out of the base alkylated dCMP-PGE adduct by a hydrolytic deamination reaction.

Upon reaction of TMP with PGE only phosphate alkylated adducts were found: one di-adduct and one mono-adduct.

These experiments prove CZE-ES-MS and CZE-ES-MS/MS to be very useful tools for DNA-adduct research. Using the developed “sample stacking” technique sufficient sample could be injected to record CID-productionspectra thus enabling the identification of the adducts.

In chapter V the DNA-adducts formed upon reaction of PGE with Calf thymus DNA were studied using the CZE- and CZE-ES-MS-analysis. Analysis of the Calf thymus DNA incubated with PGE showed that PGE causes the DNA-structure to break down. After ten hours of incubation with PGE no high molecular weight DNA could be detected. Analysis of the DNA supernatant, after DNA precipitation, by CZE revealed that this supernatant contained a lot of products which were mainly formed during the first ten hours of incubation. Only after ten hours of incubation adducts could be detected in the enzymatic DNA-hydrolysates of the DNA-pellets obtained after DNA-precipitation. This indicates that these last adducts which are mainly base alkylated are only being formed after the degradation of the DNA-structure.

Using CZE-ES-MS/MS low energy CID-productionspectra were obtained. In the DNA-supernatant a variety of PGE alkylated phosphates were identified. The presence of these adducts proves that PGE gives rise to phosphotriester bonds upon reaction with DNA which subsequently hydrolyse and cause the DNA-strand to break. In conclusion we can say that phosphate alkylation is responsible for the biological effects of PGE. Breaking of the DNA-strand points to a primarily cytotoxic effect of PGE rather than a mutagenic or carcinogenic effect, this is in agreement with the observed biological effects of PGE (as

described in chapter I). We were the first to report the detection of phosphate adduct formation by PGE and the first to report the observed DNA-strand breaking upon reaction with PGE. This reaction mechanism most probably also applies to other epoxides and could be important to fully understand the cytotoxic and/or carcinogenic properties of these epoxides.

In the last chapter research was performed towards five new platinum compounds. These investigations were carried out in the search for new chemotherapeutics. Two of these platinum compounds, CDAP and CDATP, were shown to have a cytotoxic activity comparable to that of CDDP. The cytotoxicity of these compounds was determined using the MTT-test. CZE-analysis of the reaction mixtures of these platinum compounds with Calf thymus DNA showed that there was a relation between the amount of incompletely hydrolyzed oligonucleotides present in the DNA-hydrolysates and the cytotoxicity of the compounds. This indicated that the cytotoxic activity of these compounds is caused by their interaction with DNA. In order to be able to further analyse these incompletely hydrolyzed oligonucleotides a preparative CZE separation was developed. This preparative CZE separation enabled the collection of the fractions of interest without interruption of the electrophoretic current. We were the first to report the combination of CZE with ZAAS. These experiments proved complexation with platinum to be responsible for the incomplete hydrolysis of the platinum complexed oligonucleotides. Using the CZE-ES-QTOF system we were able to show that CDAP causes di-valent bound platinum-oligonucleotide complexes to a great extend.